

**ANWENDUNG DES LIMULUS-TESTS
BEI PASTEURISIERTER MILCH ZUR ERMITTLUNG
DER KONTAMINATION MIT GRAMNEGATIVEN KEIMEN
SOWIE ZUR HALTBARKEITSVORHERSAGE**

KLAUS BACHMEIER

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0034

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan

Anwendung des Limulus-Tests bei pasteurisierter Milch
zur Ermittlung der Kontamination mit gramnegativen
Keimen sowie zur Haltbarkeitsvorhersage

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Klaus Bachmeier
aus
Töging

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. W. Leidl
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. habil. K. Osterkorn
Tag der Promotion:	26. Juli 1985

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1 Die bakterielle Flora pasteurisierter Konsummilch	2
2.2 Methoden zur Ermittlung der Kontamination mit gramnegativen Keimen und zur Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Konsummilch	6
2.3 Produktionsbegleitende Untersuchungen	22
3. Eigene Untersuchungen	31
3.1 Material und Versuchsanordnung	31
3.1.1 Untersuchungen zur Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Konsummilch	31
3.1.2 Untersuchungen der Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch	32
3.2 Methoden	32
3.2.1 Mikrobiologische Methoden	32
3.2.1.1 Bestimmung des LPS-Gehaltes pasteurisierter Konsummilch	32
3.2.1.2 Ermittlung der Rekontamination von pasteurisierter Konsummilch	35
3.2.1.2.1 Weihenstephaner Rekontaminationstiter	35
3.2.1.2.2 Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium	36
3.2.1.3 Bestimmung des Gehaltes an coliformen Keimen	36
3.2.2 Sensorische Prüfung pasteurisierter Konsummilch	36
3.3 Ergebnisse	37
3.3.1 Untersuchungen zur Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Konsummilch	37

	Seite
3.3.1.1	Mikrobiologische Untersuchungen 37
3.3.1.2	Sensorische Untersuchungen 57
3.3.1.3	Beziehungen zwischen den mikrobiologischen Befunden und der Haltbarkeit bei pasteurisierter Konsummilch 60
3.3.2	Untersuchung der Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch 68
4.	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion 80
5.	Zusammenfassung 97
6.	Summary 98
7.	Verzeichnis des Schrifttums 99
Anhang	118

1. Einleitung

Die Haltbarkeit kühlgelagerter pasteurisierter Konsummilch wird in erster Linie durch sogenannte Rekontaminationskeime bedingt, d.h. durch Mikroorganismen, die erst nach der Hitzebehandlung in die Milch gelangt sind, psychrotrophes Wachstumsverhalten zeigen und überwiegend gramnegativ sind. Sie entwickeln sich rasch zur dominierenden Keimflora und bauen Milchinhaltsstoffe unter Entwicklung sensorischer Veränderungen ab. Ein rascher Nachweis dieser Flora ist deshalb erwünscht.

Der Limulus-Test ist eine einfache, schnelle und spezifische Methode zum Nachweis der Zellwandbestandteile (Lipopolysaccharide (LPS)) gramnegativer Bakterien. Da hierbei auch die LPS abgestorbener Keime erfaßt werden, können vermehrungsfähige Bakterien mit diesem Verfahren nur aufgrund der Wachstumskinetik ermittelt werden, z.B. mit dem Limulus-Differenz-Titer, der die Zunahme der LPS sich vermehrender Keime innerhalb einer 24stündigen Inkubation bei 20° C anzeigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendung dieses am Lehrstuhl erarbeiteten Verfahrens (TERPLAN et al., 1981; JAKSCH, 1983) hinsichtlich der Rekontaminationsermittlung und der Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Milch untersucht werden. In Verbindung damit sollte geprüft werden, ob der Limulus-Test zur Kontrolle der Produktionshygiene eingesetzt werden kann.

2. Schrifttum

2.1 Die bakterielle Flora pasteurisierter Konsummilch

Die in pasteurisierter Konsummilch vorkommenden Mikroorganismen sind entweder thermodure bzw. thermoresistente Keime, die der Rohmilch entstammen und die Hitzebehandlung überstanden haben, oder sogenannte Rekontaminaten, d.h. Keime, die erst nach der Pasteurisierung in die Milch gelangt sind.

Unmittelbar nach der Pasteurisierung sind im allgemeinen nur die thermoduren bzw. thermoresistenten Keime nachzuweisen (KLEEBERGER, 1976; HEESCHEN et al., 1981; NIEMIERSKI et al., 1982; TOLLE und SUHREN, 1982). Sie gehören den Genera *Alcaligenes*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Bacillus* und *Clostridium* an (ABO-ELNAGA, 1966; STADHOUDERS, 1972 und 1975; WASHAM et al., 1977). Abgesehen von *Alcaligenes* handelt es sich dabei durchwegs um grampositive Keime (STADHOUDERS, 1972; KLEEBERGER, 1979). Arten der Spezies *Micrococcus* und *Microbacterium* sind dabei am häufigsten vertreten, gelegentlich finden sich auch Streptokokken (vor allem *S. thermophilus*) in größerer Zahl (ASHTON, 1950; KANDLER, 1960; BUSSE, 1975a; KLEEBERGER, 1976; SCHRÖDER et al., 1982).

Frisch pasteurisierte Konsummilch enthält in der Regel 10^3 - 10^5 thermodure Keime/ml (BRANDL, 1968; BUSSE, 1975a; HEESCHEN et al., 1981; SCHRÖDER et al., 1982). Während der Lagerung kommt es in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur zur Vermehrung der die Hitzebehandlung überlebenden Keime. Die Sporen der Clostridien haben im Gegensatz zu jenen der aeroben Sporenbildner (*Bacillus*arten) unter den gegebenen Sauerstoffverhältnissen kaum die Chance auszukeimen.

Die Haltbarkeit nichtrekontaminierter kühlgelagerter pasteurisierter Milch wird durch den Gehalt und insbesondere die Vermehrungsfähigkeit thermodurer Keime, deren Anzahl in Rohmilch starken jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt (JÜTTNER,

1985), begrenzt (PETTÈ, 1962; BRANDL, 1968; BUSSE, 1975a; KLEEBERGER, 1978; TOLLE et al., 1981). Mikrokokken, Mikrobakterien und Streptokokken sind unter Kühlbedingungen nur in geringem Maße vermehrungs- und stoffwechselaktiv (BUSSE, 1975a; KLEEBERGER, 1976; KREUZER, 1978; HEESCHEN et al., 1981). TINOYE und HARMON (1975) fanden z.B. für *Microbacterium flavus* und *Streptococcus faecalis* bei einer Lagerungstemperatur von 7,2° C Generationszeiten von 20,9 bzw. 18,5 Std. Weit bedeutsamer für den Verderb kühlgelagerter nichtrekontaminierter pasteurisierter Milch sind die psychrotrophen Stämme der *Bacillus*-arten (GROSSKOPF und HARPER, 1969; SHEHATA und COLLINS, 1971; LANGEVELD et al., 1973; HEESCHEN et al., 1981; MOL und VICENTIE, 1981; TOLLE et al., 1981), insbesondere *Bacillus cereus* und *Bacillus circulans* (LANGEVELD et al., 1973; STADHOUDERS, 1972 und 1975; WASHAM et al., 1977; MIKOLAJCIK, 1978; LANGEVELD und CUPERUS, 1980; STADHOUDERS et al., 1980). In Modellversuchen mit Reinkulturen ermittelte LANGEVELD (1977) für *Bacillus cereus* bei einer Lagerungstemperatur von 7° C eine Generationszeit von ca. 10 Std. Bei Temperaturen unter 6° C war keine Vermehrungsfähigkeit mehr zu verzeichnen (LANGEVELD und CUPERUS, 1980). Für *Bacillus circulans* hingegen wurde noch bei 5° C eine relativ kurze Generationszeit von 12 Std. festgestellt (LANGEVELD et al., 1973). Da die übrigen *Bacillus*-arten unter psychrotrophen Verhältnissen nicht mit *Bacillus cereus* bzw. *Bacillus circulans* konkurrieren können, sind sie für den Verderb pasteurisierter Konsummilch unbedeutend (LANGEVELD und CUPERUS, 1980). Nach TOLLE und SUHREN (1982) beginnen sensorische Veränderungen pasteurisierter Milch, wenn ca. 2×10^6 Keime/ml vorhanden sind. Unter den oben genannten Bedingungen wäre - ohne den von HEESCHEN et al. (1981) beobachteten verzögerten Wachstumsbeginn thermodururer Keime (lag-Phase) in Milch mit in die Berechnung einzubeziehen - das Ende der Haltbarkeit bei einer Ausgangskonzentration von 1 Keim/ml nach ca. 9 (*Bacillus cereus*) bzw. 11 Tagen (*Bacillus circulans*) zu erwarten.

In Modellversuchen wurde für rekontaminationsfrei abgefüllte,

pasteurisierte kühlgelagerte Milch eine erheblich längere Haltbarkeit als unter Praxisbedingungen festgestellt (Tab. 1). Die Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch wird in erster Linie durch Rekontaminationskeime begrenzt, d.h. durch Mikroorganismen, die erst nach der Hitzebehandlung in die Milch gelangt sind und sich auch unter Kühlbedingungen vermehren (PETTE, 1962; LANGEVELD et al., 1973; BUSSE, 1975a; KLEEBERGER, 1976; SUHREN et al., 1975, 1979 und 1980; LANGEVELD und CUPE-RUS, 1980; HEESCHEN et al., 1981; KIELWEIN, 1981; COUSIN, 1982; SCHRÖDER et al., 1982; TOLLE und SUHREN, 1982; BOSSUYT und WAES, 1983; SCHRÖDER, 1984; VISSER und DE GROOTE, 1984).

Diese Rekontaminationskeime entstammen dem Rohrleitungssystem der Molkerei bzw. gelangen bei der Abfüllung in die bereits hitzebehandelte Milch (Einzelheiten siehe 2.3).

Bei der Rekontaminationsflora handelt es sich überwiegend um gramnegative psychrotrophe Keime der Genera *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Chromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* (KLEEBERGER, 1976 und 1978; TOLLE et al., 1979; COUSIN, 1982; TOLLE und SUHREN, 1982) sowie Milchsäurebakterien (Milchsäurestreptokokken und Enterokokken) (PETTE, 1962; MILLER, 1966; KLEEBERGER, 1976). Während Milchsäurebakterien unter Kühlbedingungen in ihrem Wachstum stark eingeschränkt sind, vermehren sich gramnegative psychrotrophe Keime sehr schnell. Auf der Grundlage der Untersuchungen zur Kinetik der Keimvermehrung von LANGEVELD und CUPERUS (1980) berechneten TOLLE und SUHREN (1982) sehr kurze Generationszeiten bei 10° C; so z.B. für *Achromobacter* spez. 4,3 Std., für *Enterobacter hafniae* und *Klebsiella aerogenes* jeweils 4 Std. und für *Pseudomonas* spez. sogar nur 3,3 Std. Offensichtlich sind im Hinblick auf die Haltbarkeit pasteurisierter Milch die *Pseudomonaden* die bedeutendsten Rekontaminationskeime (SCHULZE und OLSON, 1960; KIELWEIN, 1971; KLEEBERGER, 1976; TOLLE und SUHREN, 1982; SCHRÖDER, 1984). Aufgrund ihrer kurzen Generationszeiten vermehren sie sich, auch wenn sie direkt nach der Pasteurisie-

Tab. 1: Haltbarkeit rekontaminationsfreier bzw. rekontaminierter pasteurisierter Konsummilch (deutschsprachiges Schrifttum)*

Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch (d)		Lagerungstemperatur (°C)	Autoren
rekontaminiert	rekontaminationsfrei		
5 - 10	> 14	< 8	KANDLER (1964)
	7	10 - 12	BUSSE (1975 b)
	7 - 8	12	WALLNER (1975)
	14	10	GERRITS (1976)
< 3	7 - 8	10 - 12	KLÉE-BERGER (1976)
4 - 5	7	11	LIMMER (1979)
5	8	9	SUHREN et al. (1979)
6	7 - 30	10	KIELWEIN (1981)
4	8	10	TOLLE u. SUHREN (1982)
1 - 3	6 - 7	10	JAKSCH (1983)

* wegen Vergleichbarkeit der Lagerungstemperatur wurde diese Auswahl getroffen.

rung nur in sehr geringer Anzahl vorliegen, derart schnell, daß vorzeitiger Verderb der Milch auch unter Kühlbedingungen eintritt. In Modellversuchen von TOLLE und SUHREN (1982) vermehrte sich 1 Rekontaminationskeim (*Pseudomonas spez.*) / 100 ml bei einer Inkubationstemperatur von 10° C innerhalb von 91 Std. auf 2×10^6 Keime/ml. Sensorisch wahrnehmbare Veränderungen sind bei Keimzahlen dieser Größenordnung bereits zu erwarten (LANGEVELD und CUPERUS, 1980; TOLLE und SUHREN, 1982). Rekontaminationsfrei abgefüllte pasteurisierte Milch war unter den oben erwähnten Lagerungsbedingungen jedoch 8 Tage haltbar.

2.2 Methoden zur Ermittlung der Kontamination mit gramnegativen Keimen und zur Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Konsummilch

Nachdem bereits in Untersuchungen von McCRADY und LANGEVIN (1932) nachgewiesen worden war, daß coliforme Keime bei ordnungsgemäßer Pasteurisierung abgetötet werden, galt deren Nachweis lange Zeit als Methode der Wahl zur Feststellung der Rekontamination pasteurisierter Milch. Da allerdings coliforme Keime in gekühlter pasteurisierter Milch nur eine relativ kleine Gruppe der für den Verderb verantwortlichen gramnegativen Rekontaminanten repräsentieren (NELSON und BAKER, 1954; BUSSE, 1966; OLSON, 1971; BLANKENAGEL, 1976; WINTERER, 1982), wurden verschiedene Methoden mit dem Ziel der Erfassung der gramnegativen psychrotrophen Keime entwickelt. Es wurden verschiedene Prinzipien zum Nachweis psychrotropher Keime bzw. zum selektiven Nachweis gramnegativer Keime eingesetzt, wobei bei letzteren eine Vielzahl unterschiedlichster selektiv wirksamer Substanzen, so z.B. grenzflächenaktive Verbindungen, Farbstoffe, Penicillin, Natriumdesoxycholat u.a. verwendet wurden. Die Verfahren zum kulturellen Nachweis gramnegativer Rekontaminationskeime in Milch und Milchprodukten sind von JAKSCH (1983) referiert worden.

Im Hinblick auf die Thematik dieser Arbeit soll im folgenden nur auf einige Verfahren eingegangen werden, die in den letzten Jahren für den Nachweis gramnegativer Rekontaminationskeime verwendet bzw. entwickelt wurden. Ein Test, für dessen Ergebnisse hauptsächlich im angelsächsischen Schrifttum gute Beziehungen zur Haltbarkeit kühlgelagerter pasteurisierter Milch beschrieben wird (ELLIKER et al., 1964; RANDOLPH et al., 1965; THOMAS, 1966; SING et al., 1967; MULL et al., 1974a und b; BLANKENAGEL, 1976; FELMINGHAM und JUFFS, 1977; COGHILL und JUFFS, 1979; BIGALKE, 1980^{a)}; BISHOP et al., 1984^{a)}) und der nach Angaben der Autoren in der Lage ist, psychrotrophe Rekontaminationskeime sehr zuverlässig anzuzeigen, ist der sogenannte MOSELEY-Test bzw. MOSELEY-keeping-quality-test (MOSELEY, 1958). Dabei wird nach einer ersten Bestimmung der Gesamtkeimzahl und nachfolgender Inkubation der Probe bei Kühltemperaturen (5 bzw. 7 Tage bei 45° F (7,2° C)) eine erneute Keimzählung durchgeführt. Eine Inkubationsdauer von 7 Tagen hat sich nach BLANKENAGEL (1976) und MOSELEY (1980) als vorteilhaft erwiesen. Nach Angaben von BLANKENAGEL (1976) kann bei der Durchführung des MOSELEY-Tests auf die Ermittlung des Ausgangswerts (erste Untersuchung) verzichtet werden.* Deshalb wird von manchen Untersuchern nur die zweite Bestimmung durchgeführt und anhand von Erfahrungsgrenzwerten eine Haltbarkeitsvorhersage getroffen bzw. Rückschlüsse auf eine Rekontamination gezogen. Bei einer hohen Differenz der Ergebnisse der beiden Gesamtkeimzahlbestimmungen (z.B. 10^5 bis 10^7 Keime/ml (WAES und BOSSUYT, 1982)) bzw. bei hohen Grenzwerten kann davon ausgegangen werden, daß es zu einer starken Rekontamination mit psychrotrophen Keimen gekommen war und eine entsprechende Einschränkung der Haltbarkeit zu erwarten ist; entsprechend niedrige Differenzwerte bzw. Grenzwerte weisen auf Rekontaminationsfreiheit bzw. lange Haltbarkeit der Proben hin. Proben mit Grenzwerten von 2100 Keimen/ml bzw. 625 Keimen/ml war entsprechend den Angaben von MULL et al. (1974) bei 7° C eine Haltbarkeit von 10

* Die in diesem Abschnitt mit ^{a)} gekennzeichneten Autoren führten Untersuchungen in diesem Sinne durch.

bzw. 14 Tagen zuzuordnen. Im Rahmen produktionsbegleitender Untersuchungen bewertete, z.B. BIGALKE (1980)^{a)}, Proben als rekontaminiert, wenn sie den Grenzwert von 10.000 psychrotrophen Keimen/ml überschritten. Nach Ansicht von BISHOP et al. (1984)^{a)} erlaubt der MOSELEY-Test keine exakte Haltbarkeitsvorhersage, sondern lediglich eine Unterscheidung von Milch guter, verminderter und stark gefährdeter Haltbarkeit. Obwohl der MOSELEY-Test eine gute Abschätzung der Rekontamination pasteurisierter Milch mit psychrotrophen Keimen erlaubt und für die Ergebnisse dieses Tests eine gute Beziehung zur Haltbarkeit festgestellt wurde, ist ein sinnvoller Einsatz in der Praxis aufgrund des späten Vorliegens der Ergebnisse (9 Tage) sehr fraglich.

In der Absicht, die i.d.R. gramnegativen psychrotrophen Rekontaminationskeime von den psychrotrophen thermoduren Keimen, die mit dem MOSELEY-Test ebenfalls erfaßt werden, zu unterscheiden, wurde von SCHRÖDER (1984) eine Bestimmung der gramnegativen psychrotrophen Keime durchgeführt. Wenn erfahrungsgemäß eine hohe Rekontamination zu erwarten war, wurden die zur Bestimmung der GKZ mit Untersuchungsmaterial beschickten Petrischalen (Milch-Agar) für 10 Tage bei 7° C bebrütet und die zur Bewertung herangezogenen kolonienbildenden Einheiten einer Gramfärbung unterzogen. Von Proben, bei denen erfahrungsgemäß weniger als 1 Rekontaminationskeim/ml zu erwarten war, wurden Teilproben (1x50 ml, 1x10 ml und 1x5 ml) 7 Tage bei 10° C praeinkubiert, anschließend von jeder Teilprobe eine Öse Material ausgestrichen und die Petrischale weitere 7 Tage bei 7° C bebrütet, bevor eine Gramfärbung in Zusammenhang mit der Keimzählung durchgeführt wurde. Zwar konnten bei diesem Vorgehen Rekontaminationen mit gramnegativen Keimen (1 Keim/100 ml) nachgewiesen und deren Einfluß auf die Haltbarkeit pasteurisierter Milch dargestellt werden, allerdings gilt für die Anwendung in der Praxis der für den MOSELEY-Test bereits oben erwähnte Nachteil (spätes Vorliegen der Ergebnisse) für diese Methode in besonderem Maße (vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Vergleichende Beurteilung von Verfahren zur Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Konsummilch

Methode	Prinzip des Verfahrens	Investitions- aufwand	Ergebnisse nach ...Std.	Beziehung zur Halt- barkeit!.) (Autoren)
MOSELEY- Test	Erfassung der Vermehrung psychrophiler Keime durch Keimzahlbestimmung vor und nach Inkubation der Probe (5 bzw. 7 Tg/7,2°C)	Ausstattung eines bakteriologischen Labors	168 - 216	+ + + + + + + + (+) + (+) RANDOLPH et al. (1965) OLSON (1971) SING (1972) FELMINGHAM und JUFFS (1977) MARTINS et al. (1982) a) BISHOP et al. (1984) a)
Weihenste- phaner Re- kontamina- tionstiter	Nach Praeinkubation der Probe (24 Std./Zimmertemperatur) selektive Erfassung gramne- gativer Keime (Auswertung im MPN-Verfahren)	Ausstattung eines bakteriologischen Labors	48	+ (+) - + (+) + + GLAESER und FEUCHT (1979) GRAF (1980) JAKSCH (1983) SUHREN et al. (1980)
Rekontamina- tionsnachweis nach LANGE- VELD	Nach Praeinkubation der Probe (24 Std./25°C) selektive Er- fassung gramnegativer Keime (Keimzählung)	Ausstattung eines bakteriologischen Labors	48	+ + LANGEVELD et al. (1976)
Modifizierter Weihenstepha- ner Rekontami- nationstiter (PCBA-Medium)	Nach Praeinkubation der Probe (24 Std./25°C) selektive Er- fassung gramnegativer Keime (Auswertung im MPN-Verfahren)	Ausstattung eines bakteriologischen Labors	48	+ (+) + + GRAF (1980) SUHREN et al. (1980)

Methode	Prinzip des Verfahrens	Investitions- aufwand	Ergebnisse nach ...Std.	Beziehung zur Halt- barkeit 1.) (Autoren)
Pyruvatdif- ferenzwert	Ermittlung der gesamten bak- teriellen Stoffwechselakti- vität vor und nach Inkuba- tion der Probe (48 bzw. 72 Std./10 - 12°C)	ca. 10 000 DM (Photometer) ca. 100 000 DM (autom. System) 2.)	48 - 72	+ + (+) +(+) (+) SUHREN et al. (1975) GRAF (1980) TOLLE et al. (1981) JAKSCH et al. (1983)
Limulus- Differenz- Titer	Ermittlung des LPS-Gehaltes gramnegativer Keime vor und nach Inkubation der Probe (24 Std./Zimmertemperatur bzw. 18 St./13°C)	Ausstattung eines bakteriologischen Labors (pyrogen- freies Arbeiten)	25 bzw. 19	+ + + + JAKSCH et al. (1983) MIKOLAJCIK und BRUCKER (1983)
ATP- Messung	Nach Praeinkubation der Probe (24 Std./30°C; Selektivmedium) Erfassung des ATP-Gehaltes gramnegativer Keime	ca. 15 000 DM (Gerät) 3.)	24	+ + WAES und BOSSUYT (1982)
Impedanz- Messung	Messung der Leitfähigkeits- änderung eines Nährmediums (infolge der Stoffwechselak- tivität sich vermehrender Keime) ohne Praeinkubation mit Praeinkubation (18 Std./18°C)	ca. 30 000 DM (ohne elektro- nisch gesteu- erte Bildaus- wertung) 3.)	13,5 ca. 24 - ca. 30	+ + + + MARTINS et al. (1982) BISHOP et al. (1984)

1.) + + gute Beziehung zur Haltbarkeit 2.) nach SUHREN et al. (1980)
+ abgeschwächte Beziehung zur Haltbarkeit 3.) nach BÜLTE (1983)

An dieser Stelle soll kurz auf die von SUHREN et al. (1980) hauptsächlich zur Vorhersage der Haltbarkeit vorgeschlagene Bestimmung des Pyruvatdifferenzwertes eingegangen werden, die ebenfalls eine gewisse Abschätzung der Rekontamination pasteurisierter Milch zuläßt und wie der MOSELEY-Test auf einer zweimaligen Untersuchung der Proben basiert. Allerdings wird bei der Pyruvatbestimmung nicht nur die auf die Anwesenheit gramnegativer Rekontaminationskeime zurückzuführende Stoffwechselaktivität, sondern jene aller im Untersuchungsmaterial vorhandenen Keime, nachgewiesen (TOLLE et al., 1972). Aus der Differenz einer Pyruvatbestimmung vor und nach 72stündiger Inkubation bei 10° C wurde von SUHREN et al. (1980) der sogenannte Pyruvatdifferenzwert gebildet und in Beziehung zur sensorisch bestimmten Haltbarkeit der Milch gesetzt. Nach Aussage der Autoren scheint der Pyruvatdifferenzwert in gleichem Maße zur Haltbarkeitsvorhersage geeignet zu sein wie ein von ihnen modifizierter MOSELEY-Test (Inkubation: 72 Std./10-12°C) bzw. der Weihenstephaner Rekontaminationstiter (siehe unten). Bei der Überprüfung der Betriebshygiene einer Molkerei wurde eine Beziehung zwischen den Pyruvatdifferenzwerten und den jeweiligen Rekontaminationsproblemen des Betriebes festgestellt. Zwar konnte JAKSCH (1983) die grundsätzliche Eignung des Pyruvatdifferenzwertes (ΔPyr) zur Vorhersage der Haltbarkeit bestätigen (Milchproben mit $\Delta\text{Pyr} < 1$ ppm/ml waren durchschnittlich 5 Tage, solche mit $\Delta\text{Pyr} > 3$ ppm/ml 3 Tage haltbar), jedoch war die Beziehung zur Haltbarkeit nicht so eng wie beim Limulus-Differenz-Titer (siehe unten) oder beim Weihenstephaner Rekontaminationstiter. Diese geringere Übereinstimmung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß bei einer Vorbebrütung von 72 Stunden und stark rekontaminierter Milch der Pyruvatgehalt bereits wieder abgefallen ist (SUHREN et al., 1980). MARSHALL und HARMON (1978) beobachteten in Anwesenheit psychrotropher gramnegativer Keime insbesondere von Pseudomonaden bei 20° C steten Anstieg innerhalb von 24 bis 48 Stunden und den anschließenden starken Rückgang des Pyruvatgehaltes. Die Autoren interpretierten dieses Phänomen als Folge einer

Metabolisierung von Pyruvat durch psychrotrophe gramnegative Keime insbesondere durch Pseudomonaden und schlugen die Ermittlung eines 24-Stunden-Pyruvatdifferenzwertes (20°C) zur Beurteilung der Rekontamination bzw. zur Haltbarkeitsvorhersage pasteurisierter Milch vor. Allerdings ist nach ihrer Erfahrung eine Ausgangskonzentration von ca. 100 Bakterien/ml (Modellversuche mit Reinkulturen gramnegativer Keime) Voraussetzung, um mit dieser Methode erfaßt zu werden. Daher dürfte das Verfahren für die Bestimmung einer Rekontamination bzw. für eine zuverlässige Haltbarkeitsvorhersage zu unempfindlich sein. Das Prinzip eines 24-Stunden-Pyruvatdifferenzwertes wurde bisher nicht weiter verfolgt.

Der von KLEEBERGER (1976) entwickelte sogenannte Weihenstephaner Rekontaminationstiter wurde vornehmlich im deutschsprachigen Raum in zahlreichen Untersuchungen angewandt (KREUZER, 1978; GLÄSER und FEUCHT, 1979; GRAF, 1980; BRANDL, 1982; WINTERER, 1982; JAKSCH, 1983). Bei dieser Methode wird nach einer 24stündigen Belastung (Anreicherung) bei Zimmertemperatur von frisch pasteurisierter, in Röhrchen zu 3 x 10 ml, 3 x 1 ml und 3 x 0,1 ml abgefüllter Milch von jedem Röhrchen je eine Öse Material auf ein Selektivmedium (bestehend aus zwei Teilen Plate-Count-Agar und einem Teil Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar) ausgestrichen und weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur bebrütet. Die Auswertung erfolgt im MPN-Verfahren. Nachgewiesen werden gramnegative Keime und Enterokokken bei einer Nachweisgrenze von 4 Rekontaminationskeimen/100 ml.

KLEEBERGER (1976) teilte die zu beurteilende Milch hinsichtlich der zu erwartenden Haltbarkeit entsprechend der Anzahl der nachgewiesenen Rekontaminationskeime in vier Qualitätsstufen ein:

Qualitätsstufe I: (ausgezeichnete Qualität)	weniger als 4 Keime/100 ml Haltbarkeit: ca. 7-8 Tage
Qualitätsstufe II: (gute Qualität)	bis zu 10 Keime/100 ml Haltbarkeit: ca. 5 Tage
Qualitätsstufe III: (befriedigende Qualität)	11-100 Keime/100 ml Haltbarkeit: ca. 3 Tage
Qualitätsstufe IV: (gefährdete Milch)	mehr als 100 Keime/ml Haltbarkeit: i.d.R. nicht länger als 3 Tage

GRAF (1980) und BRANDL (1982) konnten zwar in vergleichenden Untersuchungen in bezug auf die Erfassung von Rekontaminationskeimen die Überlegenheit des Weihenstephaner Rekontaminationstitors gegenüber dem Nachweis coliformer Keime bestätigen; GRAF (1980) beurteilte jedoch den Test für die Abschätzung des Verderbnisrisikos nur als eingeschränkt geeignet. Nach Aussage von GLÄSER und FEUCHT (1979) ist zumindest bei guter (Qualitätsstufen I und II) und gefährdeter Milch (Qualitätsstufe IV) eine einigermaßen sichere Haltbarkeitsprognose möglich. Dies konnte von JAKSCH (1983), neben statistisch allgemein guter Übereinstimmung mit der sensorisch bestimmten Haltbarkeit, vornehmlich für die Qualitätsstufen I und IV bestätigt werden. Entsprechend den Erfahrungen von NÖBL (1981) und WINTERER (1982) ist der Weihenstephaner Rekontaminationstiter als brauchbar für die Haltbarkeitsvorhersage zu beurteilen.

Bei der Rekontaminationsbestimmung nach LANGEVELD (LANGEVELD et al., 1976) wird nach Praeinkubation (24 Std./25°C) mittels einer Spezialöse 0,01 ml der Probe auf Plate-Count-Agar mit Zusatz von 100 ppm Benzalkon ausgestrichen und 24 Stunden bei 30° C bebrütet. Nach Aussagen der Autoren werden 20 gramnegative Rekontaminationskeime/l nachgewiesen; handelt es sich um Keime mit kurzen Generationszeiten

(<1,36 Std. bei 25°C), kann sogar noch 1 Keim/l erfaßt werden. Auf dem PCBA-Medium wachsen nach Angaben von LANGEVELD et al. (1976) nur gramnegative Rekontaminationskeime, allerdings können sich gemäß Untersuchungen von WAES und BOSSUYT (1981) vereinzelt auch aerobe Sporenbildner entwickeln. LANGEVELD et al. (1976) fanden gute Übereinstimmung der Ergebnisse ihres Tests mit der Haltbarkeit der bei 7° C gelagerten Milch.

GRAF (1980) sowie SUHREN et al. (1980) ermittelten den Weihenstephaner Rekontaminationstiter auf dem von LANGEVELD et al. (1976) vorgeschlagenen Nährmedium und konnten übereinstimmend die Brauchbarkeit des Nährmediums in Verbindung mit der von KLEEGERGER (1976) vorgeschlagenen Verfahrensweise für die Vorhersage der Haltbarkeit pasteurisierter Milch bestätigen.

Nachdem TERPLAN et al. (1975) die Eignung des Limulus-Tests zum Nachweis gramnegativer Keime in Milch festgestellt hatten und dies von zahlreichen Autoren für Milch und Milchprodukte bestätigt worden war (MØLLER-MADSEN et al., 1980; SÜDI et al., 1981; TERPLAN et al., 1981; ZAADHOF und TERPLAN, 1981; HANSEN et al., 1982; JAKSCH et al., 1982; SÜDI et al., 1982; JAKSCH et al., 1983a und b; MIKOLAJCIK und BRUCKER, 1983; RONDINI et al., 1984; SÜDI und HEESCHEN, 1984) wurde auf Anregung von TERPLAN et al. (1981) der sogenannte Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) zum Nachweis gramnegativer Keime und zur Haltbarkeitsvorhersage pasteurisierter Milch eingesetzt (JAKSCH, 1983; JAKSCH et al., 1983a und b; MIKOLAJCIK und BRUCKER, 1983).

Das Prinzip des Tests, der ausführlich in der Arbeit von JAKSCH (1983) besprochen wird, sei an dieser Stelle in Kürze dargestellt:

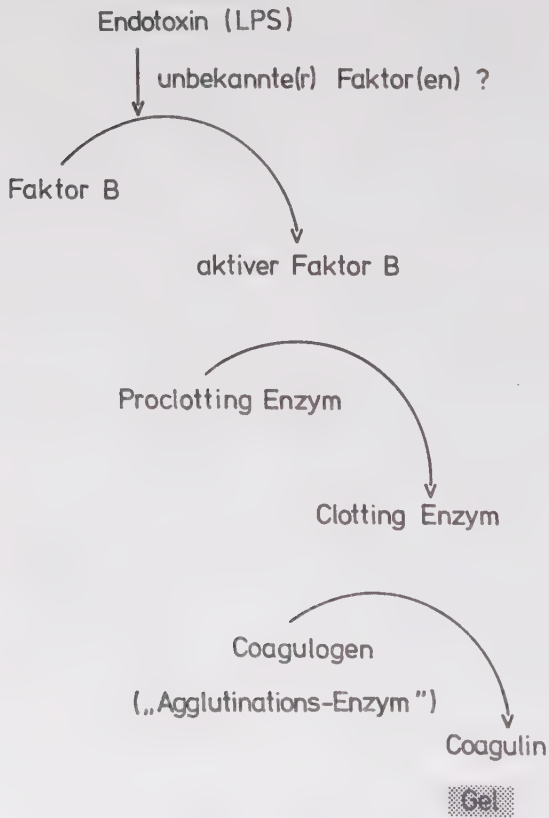
Die Blutkörperchen (Amoebozyten) des Pfeilschwanzkrebsses *Limulus polyphemus* enthalten ein Enzymsystem, das bei Kontakt mit den hitzestabilen und als Lipopolysaccharide (LPS) bzw. Endotoxine bezeichneten Wandsubstanzen gramnegativer Keime

auch in vitro eine der Blutgerinnung ähnliche Gelbildung hervorruft (Abb. 1). Bei der Durchführung des Tests werden gleiche Mengen lysierter Amoebozyten, sogenannte Limulus-Amoebozyten-Lysate (LAL) und Untersuchungsmaterial vermischt und die Gelbildung nach einstündiger Inkubation im Wasserbad (37°C) beurteilt. Die Empfindlichkeit der LAL-Lysate (0,05 ng LPS/ml und darunter) wird international in Endotoxineinheiten (EU) angegeben, bezogen auf Referenz-Standard-Endotoxine (RSE) aus *E. coli*. Dabei entspricht eine Endotoxineinheit der Wirksamkeit von 0,1 ng des gegenwärtig gebräuchlichen Referenz-Standard-Endotoxins EC 5 (MALLINCKRODT). Endotoxinkonzentrationen von 0,05 - 0,1 ng LPS/ml (0,5 - 1 EU/ml) liegen im allgemeinen vor wenn 10^2 - 10^3 gramnegative Keime/ml im Untersuchungsmaterial vorhanden sind (STUMACHER et al., 1973; TERPLAN et al., 1975; COATES, 1977; FLEISCHER et al., 1981), wobei Unterschiede zwischen einzelnen Gattungen und Spezies bestehen können. HEESCHEN et al. (1984) sowie SÜDI und HEESCHEN (1984) ordnen 1 ng LPS/ml Rohmilch ca. 5000 gramnegative Keime/ml bzw. 10000 psychrotrophe Keime/ml zu. Aufgrund der oben erwähnten und von den Autoren selbst angesprochenen artspezifischen Unterschiede im LPS-Gehalt der Zellwand gramnegativer Keime sind derartige Relationen allerdings zurückhaltend zu beurteilen.

Da mit dem Limulus-Test auch "gelöste" oder "freie" Endotoxine sowie an abgestorbene gramnegative Keime gebundene Endotoxine erfaßt werden (STUMACHER et al., 1973), ist nach ZAADHOF und TERPLAN (1981) eine exakte Aussage über den Gehalt an vermehrungsfähigen Gramnegativen im Untersuchungsmaterial - insbesondere wenn es einer Behandlung (Erhitzung, Säuerung) unterzogen wurde - nicht möglich.

Der ursprünglich als Röhrchentest (siehe BUCHHOLZ-BERCHTOLD, 1977) durchgeführte Limulus-Test ist mittlerweile als reagenz-kostensparendes Mikrotitersystem (SÜDI et al., 1981) in Form gebrauchsfertiger, teilweise mit gefriergetrocknetem Lysat beschichteten Mikrotitertabletts im Handel erhältlich (MALLINCKRODT). Die genaue Versuchsdurchführung des Limulus-Tests mittels dieser Mikrotiterplatten ist im Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben.

Abb. 1: Biochemische Grundlagen des Limulus-Tests (nach OHKI et al., 1980)



Um in pasteurisierter Milch den Nachweis einer Kontamination mit gramnegativen Keimen (sog. Rekontamination) rasch erbringen zu können, wurde von JAKSCH (1983) sowie MIKOLAJCIK und BRUCKER (1983) der sogenannte Limulus-Differenz-Titer (TERPLAN et al., 1981) ermittelt und zur Haltbarkeitsvorhersage genutzt.

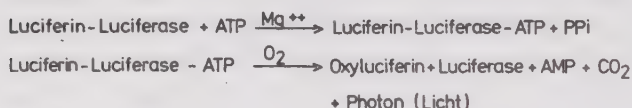
Bei der Bestimmung des Limulus-Differenz-Titers wird in einer ersten Untersuchung der Probe der Ausgangstiter festgestellt. Nach Inkubation der Probe für eine bestimmte Zeit bei einer bestimmten Temperatur (JAKSCH (1983): 24 Std./Zimmertemperatur; MIKOLAJCIK und BRUCKER (1983): 18 Std./13°C) erfolgt eine erneute Titerbestimmung. Die Differenz der beiden Ergebnisse wird als Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) bezeichnet. Ein deutlicher Anstieg dieses Wertes ist ein Hinweis auf die Vermehrung gramnegativer Keime im Untersuchungsmaterial. In entsprechenden Untersuchungen von JAKSCH (1983), der ergänzend zum ΔLT_{24} den bereits erwähnten Weihenstephaner Rekontaminationstiter (WRT) bestimmte, waren einerseits Proben mit $\Delta LT_{24} < 0,5$ bzw. mit weniger als 3 Rekontaminationskeimen/100 ml durchschnittlich 5 Tage haltbar, andererseits waren Proben mit $\Delta LT_{24} \geq 1$ bzw. mehr als 100 Rekontaminationskeimen/100 ml durchschnittlich nur 3-4 Tage haltbar. Nach Angaben von MIKOLAJCIK und BRUCKER (1983) entspricht ein Anstieg des LPS-Titers (innerhalb 18 Std. bei 13°C) um mindestens 2 log-Stufen einem Grenzwert im MOSELEY-Test von log. 6,25 und eignet sich gut, um schlechte Haltbarkeit pasteurisierter Milch vorherzusagen.

Die ATP-Messung wurde erstmals von BOSSUYT (1981) zur Abschätzung der bakteriologischen Qualität von Rohmilch herangezogen und von WAES und BOSSUYT (1981) zum Nachweis der Rekontamination pasteurisierter Milch mit gramnegativen Keimen vorgeschlagen.

Bei der Bestimmung des ATP-Gehaltes von Bakterienzellen wird mit Hilfe des Biolumineszenzsystems der Glühwürmchen (Luciferin-Luciferase) pro Molekül bakteriellen ATP's ein Photon freigesetzt (siehe Reaktionsschema). Das dabei entstehende Licht-

signal wird photometrisch in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Die Zahl der RLU ist direkt proportional zum ATP-Gehalt der untersuchten Proben und ermöglicht insofern den Rückschluß auf deren Keimgehalt (BOSSUYT, 1981; RAMEY und TSAI, 1983).

Reaktionsprinzip der ATP-Bestimmung nach BOSSUYT (1981)



Bei der Ermittlung einer Rekontamination pasteurisierter Milch werden Proben mit Benzalkon (0,05 %) und Kristallviolett (0,02 %) versetzt und nach 24stündiger Inkubation bei 30° C der bakterielle ATP-Gehalt mit der von BOSSUYT (1981) beschriebenen Methode bestimmt. Um Kontaminationen von 1 Keim/l erfassen zu können, darf die Generationszeit der kontaminierenden Keime 0,81 Std. bei 30°C nicht überschreiten, da sonst die einem ATP-Grenzwert von 1000 RLU (relative Lichteinheiten) entsprechende Keimzahl von ca. 650 000/ml unter den genannten Bedingungen nicht erreicht wird. Da dies nicht immer der Fall ist (LANGEVELD und CUPERUS, 1980) beschrieben für *Achromobacter* B 37 eine Generationszeit von 0,9 Std./30° C (vgl. WAES und BOSSUYT, 1981)), ist mit der Methode nicht immer der Nachweis von 1 Rekontaminationskeim/l möglich, insbesondere auch deshalb, weil gramnegative Keime durch die selektiven Substanzen (Benzalkon, Kristallviolett) in ihrem Wachstum verlangsamt werden können (WAES und BOSSUYT, 1981). Darüber hinaus besteht nach Angaben der Autoren die Möglichkeit, daß gelegentlich auch Enterokokken als Rekontaminaten erfaßt werden. Im Gegensatz zu einer einmaligen Untersuchung von 1-Liter-Proben, die nur den Rückschluß zuläßt, ob die Probe kontaminiert war oder

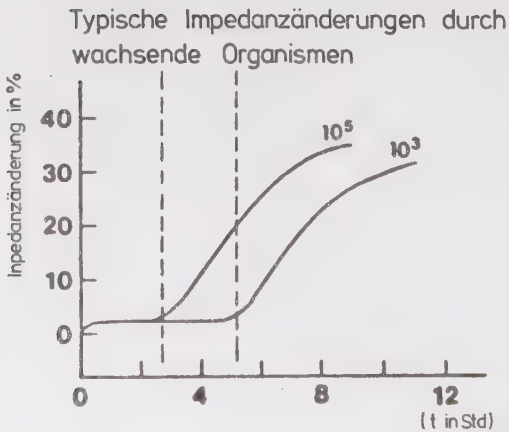
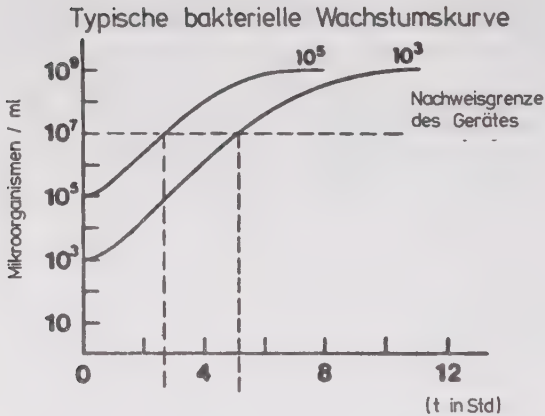
nicht, wird eine quantitative Aussage bezüglich der Rekontaminationskeime durch Untersuchung verschiedener Probenvolumina (3×100 ml, 3×10 ml, 3×1 ml) und Auswertung im MPN-Verfahren möglich (WAES und BOSSUYT, 1981).

Im Rahmen vergleichender Untersuchungen mit dem Rekontaminationsnachweis nach LANGEVELD et al. (1976) und dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter erwies sich die BC-ATP-Methode als gleichwertige Methode (WAES und BOSSUYT, 1981); auch nach Ansicht von WINTERER (1982) (orientierende Untersuchungen ($n=5$)) scheint sie für diesen Zweck geeignet zu sein.

Hinsichtlich einer möglichen Haltbarkeitsvorhersage wurde die BC-ATP-Methode dem MOSELEY-Test als ebenbürtig beurteilt; allerdings liegen die Ergebnisse bereits nach 24 Std. vor.

Bei der Impedanzmessung wird die elektrische Widerstands- oder Leitfähigkeitsveränderung (im englisch-sprachigen Schrifttum als impedance bzw. conductance bezeichnet) gemessen, die insbesondere bei der Vermehrung von Mikroorganismen durch entstehende Stoffwechselprodukte in einem flüssigen Medium auftritt. Meßbare Veränderungen (Schwellenwert) sind i.d.R. zu registrieren, wenn Bakterien eine Konzentration von ca. 10^6 bis 10^7 /ml im Nährmedium erreicht haben (HARDY et al., 1977; CADY et al., 1978; EDEN und EDEN, 1984). Die Zeit, die bis zum Erreichen des Schwellenwertes verstreicht, wird als Nachweiszeit (impedance detection time, IDT) bezeichnet und ist abhängig von der Ausgangskonzentration der Bakterien im Nährmedium und deren Generationszeit bei der während der Messung gewählten Temperatur sowie von der Zusammensetzung des Nährmediums (UR und BROWN, 1975; RICHARDS et al., 1978; FIRSTENBERG-EDEN, 1983; FIRSTENBERG-EDEN und TRICARICO, 1983). Die Nachweiszeit (IDT) verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Ausgangskonzentration der Bakterien im Nährmedium, d.h. bei ursprünglich niedriger Bakterienkonzentration resultiert lange IDT und umgekehrt (CADY et al., 1978; EDEN und EDEN, 1984) (vgl. Abb. 2). Einzelheiten zum Prinzip und zur Durchführung

Abb. 2: Beziehung zwischen mikrobiellem Wachstum und Impedanzänderung (nach CADY et al. 1978).



der Methode sind den Arbeiten von UR und BROWN (1975), CADY et al. (1978), RICHARDS et al. (1978), BAYNES et al. (1983), EDEN und EDEN (1984) sowie FIRSTENBERG-EDEN und ZINDULIS (1984) zu entnehmen.

Nachdem die Impedanzmessung bereits von CADY et al. (1978), O'CONNOR (1979), GNAN und LUEDECKE (1982) sowie MARTINS et al. (1982) als geeignet zur Keimgehaltsbestimmung (Gesamtkeimzahl- bzw. Psychrotrophenbestimmung) in Rohmilch und pasteurisierter Milch beschrieben worden war, schlugen BOSSUYT und WAES (1983) die Methode zur Bestimmung der Rekontamination pasteurisierter Milch vor. Unter Verwendung der von WAES und BOSSUYT (1981) für die BC-ATP-Methode beschriebenen Selektivsubstanzen (0,06 % Benzalkon, 0,02 % Kristallviolett) wurde für 1-Liter-Proben (Inkubationstemperatur 30°C) die Impedanz-Nachweiszeit (IDT) ermittelt. Proben, die sich in Vergleichsuntersuchungen mit der BC-ATP-Methode als in 1 l nicht kontaminiert erwiesen hatten, erforderten jeweils eine IDT > 24 Std., während rekontaminierte Proben den für die Messung ausschlaggebenden Schwellenwert bereits innerhalb von 12 bis 13 Stunden erreicht hatten. Da allerdings derartige Messungen keine quantitative Aussage über den Gehalt an Rekontaminationskeimen in der Probe zulassen, schlugen die Autoren analog der BC-ATP-Methode gleichzeitige Messungen mehrerer Teilproben unterschiedlichen Volumens und Auswertung im MPN-Verfahren vor.

In den Untersuchungen von VISSER und DE GROOTE (1984) wurden Originalpackungen pasteurisierter Milch für 18 Std. bei 25°C vorbebrütet, anschließend 1 ml Probe mit 9 ml eines selektiven Mediums versetzt (EC-Medium Difco); detaillierte Beschreibung siehe VISSER und DE GROOTE (1984), in dem sich nach Aussage der Autoren nur nichtthermodure gramnegative Bakterien entwickeln können und während 24 Std. bei einer Inkubationstemperatur von 30°C die elektrische Leitfähigkeit gemessen. Proben, die innerhalb der genannten Zeit den meßbaren Schwellenwert überschritten, wurden als kontaminiert gewertet. Mit diesem Ver-

fahren war es möglich, innerhalb von 42 Std. ca. 92 % der mit der von LANGEVELD et al. (1976) beschriebenen Methode als rekontaminiert erwiesenen Proben zu erfassen. Nachdem CADY et al. (1978) nach orientierenden Versuchen die Impedanzmessung bereits für die Haltbarkeitsvorhersage pasteurisierter Milch vorgeschlagen hatten, gelang es MARTINS et al. (1982) anhand von Impedanzmessungen (Inkubationstemperatur 32°C, Nährmedien: Trypticase-Soja-Bouillon mit 0,1 % Hefeextrakt bzw. Standardmethodenbouillon mit 0,5 % Natriumsulfat, innerhalb von 13,5 Std., bei guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der sensorischen Haltbarkeitsbestimmung (80 % wurden korrekt zugeordnet), Milch langer Haltbarkeit (> 12 Tage bei einer Lagerungstemperatur von 7°C) von solcher mit kurzer Haltbarkeit (< 12 Tage) zu unterscheiden. BISHOP et al. (1984) praeinkubierten 5 ml Probe in von den Autoren modifiziertem Plate Count Agar (genaue Angaben sind der Arbeit zu entnehmen) für 18 Std. bei 18°C und ermittelten im Anschluß daran die IDT. Proben mit einer IDT $\leq 6,1$ Stunden waren bei 7°C nicht länger als 9 Tage, solche mit einer IDT von $\geq 12,4$ Stunden jedoch wenigstens 9 Tage oder länger haltbar. Die Ergebnisse der Impedanzmessung standen bei diesen Untersuchungen in besserer Beziehung zur sensorisch ermittelten Haltbarkeit als jene des von den Untersuchern ebenfalls durchgeführten MOSELEY-Tests. Inwiefern die Ergebnisse der Impedanzmessung insbesondere unter Verwendung nichtselektiver Nährmedien bzw. unter Berücksichtigung der Ergebnisse von BOSSUYT und WAES (1983) sowie VISSER und DE GROOTE (1984) eine zuverlässige Haltbarkeitsvorhersage für bei 10°C gelagerte pasteurisierte Milch erlauben, wurde bisher noch nicht geprüft.

2.3 Produktionsbegleitende Untersuchungen

Wie in Abschnitt 2.1 bereits dargestellt, wird die Haltbarkeit pasteurisierter kühlgelagerter Milch entscheidend durch gramnegative Keime, die erst nach der Wärmebehandlung in die Milch gelangt sind (sog. Rekontaminationskeime) beeinflusst (vgl. Tab.1).

Folglich ist eine Verlängerung der Haltbarkeit durch Verhinderung und gezielte Bekämpfung der Rekontamination zu erreichen. Voraussetzung dafür sind allerdings empfindliche Verfahren, mit denen, insbesondere im Hinblick auf ein rasches Eingreifen in den Produktionsprozeß, bestehende Rekontaminationen schnell erkannt bzw. die verantwortlichen Rekontaminationsquellen lokalisiert werden können.

Zwar wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden als für diesen Zweck geeignet empfohlen, z.B. der MOSELEY-Test, Bestimmung des Pyruvatdifferenzwertes, Weihenstephaner Rekontaminationstiter, Rekontaminationstiter nach LANGEVELD, BC-ATP-Methode nach WAES und BOSSUYT, Impedanz-Messung, Limulus-Differenz-Titer sowie die Bestimmung der psychrotrophen Keimzahl nach eventueller Praeinkubation (vgl. 2.2) und zahlreiche Untersuchungen in bezug auf die Feststellung einer Rekontamination im Produkt durchgeführt (KLEEBERGER, 1976; SUHREN et al., 1980; GRAF, 1980; WAES und BOSSUYT, 1981; WINTERER, 1981; MARTINS et al., 1982; BOSSUYT und WAES, 1983; JAKSCH et al., 1983; MIKOLAJCIK und BRUCKER, 1983), doch liegen nur vereinzelte Angaben über praktische Erfahrungen bezüglich produktionsbegleitender Untersuchungen zur Überwachung der Produktionshygiene vor. In diesem Zusammenhang wurden Untersuchungen bislang nur mit dem MOSELEY-Test (ELLIKER et al., 1964; SING et al., 1967; BIGALKE, 1980), dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter (KREUZER, 1978) sowie der Psychrotrophenbestimmung mit anschließender Gramfärbung (SCHRÖDER, 1984) durchgeführt (siehe 2.2). Frühere Erkenntnisse wurden gewonnen durch Ermittlung des Colititers (LIMMER, 1957; BECK, 1959), Bestimmung der Gesamtkeimzahl vor und nach einer Inkubation von 24 Std. bei 15° C mit anschließender Gramfärbung sowie Titrierung des Säuregrades nach Aufbewahren der Probe während 48 Std. bei 20° C (Bestimmung der Stoffwechselaktivität rekontaminierender Milchsäurebakterien) (PETTE, 1962) sowie einmalige Bestimmung der psychrotrophen Gesamtkeimzahl ohne Praeinkubation (verschiedene Zeit-Temperatur-Kombinationen (7-21 Tage bei 3-5° C bzw. 7° C) bei der Bebrütung des Nährmediums) (THOMAS, 1966).

Es sei hier nur noch am Rande darauf verwiesen, daß mit der Bestimmung des Colititers lediglich ein Teil der gramnegativen psychrotrophen Rekontaminationskeime erfaßt wird. Wie bereits erwähnt, werden Milchsäurebakterien bei Kühltemperaturen stark in ihrer Vermehrungsfähigkeit unterdrückt und sind deshalb in kühlgelagerter Mlch nicht für den Verderb verantwortlich zu machen.

Zwar kann nach übereinstimmender Ansicht durch eine Keimzahlbestimmung direkt nach der Pasteurisierung, auch bei Einbeziehung der gramnegativen Keime, der Nachweis einer die Haltbarkeit der Milch beeinflussenden Rekontamination nicht erbracht werden, da nicht zwischen thermoduren und rekontaminierenden Keimen unterschieden werden kann (KANDLER, 1960; STORGARDS, 1961; JOHNS, 1969; OLSON, 1971; PATEL und BLANKENAGEL, 1972; BLANKENAGEL, 1976; OLIVERIA und PARMELEE, 1976; KLEEBERGER, 1978), jedoch kann u.U., wenn es sich um starke Rekontaminationen handelt, bei produktionsbegleitenden Untersuchungen (ordnungsgemäße Probennahme entlang der Produktionslinie (inline-sampling)) auch mit dem von THOMAS (1966) beschriebenen Vorgehen Aufschluß über eine Rekontaminationsquelle erhalten werden. Bei mehreren in der Produktionslinie hintereinander liegenden Rekontaminationsquellen wird allerdings eine sichere Lokalisation schwer möglich sein. Geringgradige Rekontaminationen, z.B. 3-10 Keime/100 ml (KLEEBERGER, 1976), sind nur durch Verfahren, die eine Praeinkubation der Proben bzw. eine Bestimmung vor und nach einer Praeinkubation beinhalten (KLEEBERGER, 1976 und 1978; LANGEVELD et al., 1976; WAES und BOS-SUYT, 1981 und 1982), nachzuweisen. Als Ursachen der Rekontamination pasteurisierter Milch kommen einerseits ungenügende Reinigung und Desinfektion der Produktionsanlagen in Frage, andererseits Konstruktionsmängel und Schäden im komplexen Leitungs- und Behältersystem, das die Milch zwischen Hitzebehandlung und Abfüllung durchläuft (LIMMER, 1979; DREWS et al., 1983). Feinste Haarrisse oder undichte Stellen der Heißhalteabteilungen bzw. im Plattensystem von Wärmetauschern, über die u.U. die

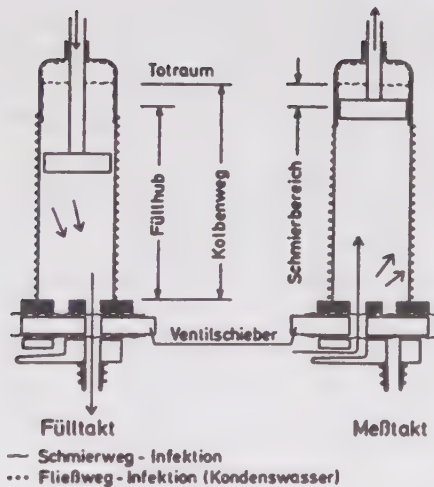
bereits pasteurisierte Milch in Kontakt mit der auf der Gegenseite unter höherem Druck fließenden Rohmilch kommen kann, stellen eine der ersten Kontaminationsmöglichkeiten der bereits hitzebehandelten Milch dar (LIMMER, 1957; BECK, 1959; THOMAS, 1966). Schadhafte Ventile, Dichtungen und Rohrleitungsverbindungen ermöglichen das Eindringen von Rekontaminationskeimen, meist in Verbindung mit keimhaltigem Wasser bzw. nicht hitzebehandelter Milch (MROZEK, 1970; LIMMER und SCHEDDIN, 1978; BIGALKE, 1980). Im allgemeinen steigt das Risiko einer Rekontamination mit der Länge der Produktionslinie (LIMMER und SCHEDDIN, 1978). Konstruktionsbedingte Mängel stellen einen entscheidenden Faktor für das Ausmaß einer Rekontamination dar. Wie den Untersuchungen von GRASSHOFF (1980) zu entnehmen ist, können sich in Toträumen, deren Länge mehr als zwei Rohrdurchmesser beträgt, aufgrund herabgesetzter Strömungsgeschwindigkeit des Füllgutes Ablagerungen und Verunreinigungen ansammeln und festsetzen. Da derartige Toträume in Zu- und Ableitungen, Rohrverzweigungen, insbesondere Dreiwegehähne bzw. T-Stücke wie auch Ventile, Dichtungen und Teile eingebauter Misch-, Meß- und Steuervorrichtungen sowie schadhafte Oberflächen (Haarrisse, Kratzer, poröse bzw. korrodierte Stellen, Unebenheiten infolge unsachgemäß durchgeführter Schweißarbeiten) schwer zu reinigen und zu desinfizieren sind (MROZEK, 1970; LIMMER, 1979; BIGALKE, 1980; DREWS et al., 1983) können sich in den entstehenden, bereits erwähnten, nährstoffhaltigen Ablagerungen Rekontaminationskeime ansiedeln und sich u.a. während der Betriebsruhe anreichern. Derartige Keimanreicherungen sind auch durch thermische Desinfektion schwer zu beseitigen, da die Ablagerungen den zu bekämpfenden Bakterien einen nicht unerheblichen Wärmeisolationsschutz bieten (MROZEK, 1970). Im Zusammenhang mit produktionsbegleitenden Untersuchungen in zwei Molkereien beobachtete SCHRÖDER (1984) bei Proben frisch abgefüllter pasteurisierter Milch, die zu Beginn einer Tagesproduktion entnommen worden waren, relativ starke Rekontaminationen mit gramnegativen psychrotrophen Keimen (z.T. >161/100 ml). In einem Falle konnte dies für die bereits hitzebehandelte

Milch des der Abfüllanlage vorgeschalteten Tanks bestätigt werden. Gegen Mitte der Produktionszeit waren nur noch einige wenige Rekontaminationskeime nachweisbar, während sich gegen Ende der Tagesproduktion wiederum ein leichter Anstieg andeutete. Die Autorin erklärte die Befunde mit der oben erwähnten Keimanreicherung während der Betriebsruhe und infolgedessen mit verstärkter Keimausschwemmung bei Produktionsbeginn. Derartige Überlegungen waren bereits von MARSHALL und HARMON (1978) angestellt worden.

Als wichtigste Ursache der Rekontamination wird allgemein der Abfüllprozeß, insbesondere die Abfüllanlage, angesehen (THOMAS, 1966; SING et al., 1967; MROZEK, 1970; LIMMER und SCHEDDIN, 1978; MOSELEY, 1980; DREWS et al., 1983; SCHRÖDER, 1984). Aufgrund der komplizierten Bauart mit vielen beweglichen Teilen, Dichtungen, Meß- und Dosiervorrichtungen ist einerseits eine ordnungsgemäße Reinigung und Desinfektion besonders schwer durchzuführen, andererseits kann gerade hier eine eventuelle Keimbesiedelung durch die zahlreichen beweglichen Teile über die gesamte Abfüllanlage verteilt werden und eine massive Rekontamination der Milch zur Folge haben (MROZEK, 1970; DREWS et al., 1983).

Prinzipiell ist zu unterscheiden zwischen der Abfüllung in vorgefertigte Behälter oder Verpackungen und der sogenannten kontinuierlichen Abfüllung (MROZEK, 1970; VÖGELE 1978). Auf mögliche Infektionswege beim ersten Verfahren hat MROZEK (1970) hingewiesen. Er unterscheidet zwischen Fließweginfektion durch Kondenswasser, welches bei der Abfüllung insbesondere gekühlter Produkte an den Außenflächen der Füllorgane entsteht (siehe auch BIGALKE, 1980) und Infektionen, die durch Produktverschmierungen (sog. Schmierbrücken) an beweglichen Elementen des Füllers auftreten. Derartige Schmierbrücken treten vor allem zwischen Dosierkolben und -zylindern und an den ständig bewegten Produktionsventilen auf (vgl. SING et al., 1967) (siehe Abb. 3). Beim Meßtakt können u.U. Rekontaminationskei-

Abb. 3: Infektionsausbreitungswege bei Abfüllanlagen
für gekühlte Flüssigerzeugnisse
(nach MROZEK, 1970)



me mit dem beim Fülltakt entstehenden Schaum in Abhängigkeit vom Anlagentyp (vgl. SING et al., 1967) ins Füllorgan angesaugt und auf diesem Weg in die Anlage verschleppt werden (VÖGELE, 1978). Dazu kommt der schnelle Verschleiß von Dichtungsmaterialien (Dichtringe und Membranen) infolge mechanischer und thermischer Beanspruchung. Während langer Produktionszeiten kann es zum Aufbau von Kontaminationsquellen innerhalb solcher Füllsysteme kommen (VÖGELE, 1978). Die Beobachtungen von SCHRÖDER (1984) (leichter Anstieg der Rekontaminationskeimzahlen gegen Ende der Tagesproduktion) ließen sich in diesem Sinne erklären.

Bei der sogenannten kontinuierlichen Abfüllung wird die Milch über ein ständig geöffnetes Produktventil und ein Füllrohr in einen Packmaterialschlauch gefüllt, wobei der Füllstand über einen Klappenschwimmer geregelt wird. Anschließend werden die Packungseinheiten unter dem Füllspiegel versiegelt. Dieses Verfahren bietet innerhalb des Produktweges weit weniger Möglichkeiten für das Entstehen einer Kontaminationsquelle. Die Kontamination ist in erster Linie durch den Keimgehalt des Verpackungsmaterials bedingt (VÖGELE, 1978). Nach Angaben von BOCKELMANN (1973) ist das Verpackungsmaterial mit ca. $0,02-0,05$ Keimen/cm² belastet. Dies entspricht nach Berechnungen von VÖGELE (1978) ca. 25 Keimen/1-Liter-Packung, wobei die Anwesenheit gramnegativer Keime nicht auszuschließen ist (bis zu ca. 9 % (BOCKELMANN, 1973)).

Bei der "Verpackung von der Rolle" im Zusammenhang mit der Abfüllung in (während des Abfüllprozesses) vorgefertigte Verpackungen kann nach dem Abwickeln einer Verpackungsbahn Kontakt mit Bakterien aus der Raumluft nicht ausgeschlossen werden (VÖGELE, 1978). Bei zu trockener Lagerung des Verpackungsmaterials entwickelt sich während des Abrollens von der Vorratsrolle eine gewisse elektrostatische Ladung des meist kunststoffbeschichteten Kartons und bindet (keimhaltigen) Staub aus der Umgebung der Abfüllanlage (DREWS et al., 1983). Derartige Kontaminationen können vermieden werden, wenn die gesamte Mechanik der Abfüllanlage durch ein Gehäuse, in dem ein geringer Überdruck erzeugt wird, von der Betriebsraumatmosphäre abgekapselt wird (DREWS et al., 1983).

Als bedenklich im Sinne einer möglichen Rekontaminationsquelle wird die Abfüllung in Flaschen beurteilt (THOMAS, 1966; SCHLÜSSLER und MROZEK, 1968; LUBIENIECKI, 1970; MROZEK, 1970), insbesondere im Hinblick auf die Gefahr einer Kontamination während des Nachspülens mit Trinkwasser beim Reinigungsprozeß (MROZEK, 1970). Angaben aus der Literatur hinsichtlich der unterschiedlichen Rekontaminationsquellen, die bei produktionsbegleitenden Untersuchungen festgestellt wurden, sind der Tabelle 3

Tab. 3 : Lokalisation von Rekontaminationsquellen bei produktionsbegleitenden Untersuchungen (Angaben aus der Literatur).

Quelle der Rekontamination	Untersuchungs- verfahren	Autoren
Kühler , Tank	Coli-Titer	LIMMER (1957)
Tank *	Coli-Titer	BECK (1959)
Tank , Abfüllanlage	Säuregradbestimmung Keimzahlbestimmung mit anschließender Gramfärbung	PETTE (1962)
Abfüllanlage , Flasche , Verpackung	Moseley-Test	ELLIKER et al. (1964)
Heißhalter , Kühler, Abfüllanlage , Flasche	Psychrotrophenbe- stimmung (verschie- dene Zeit- und Temperaturkombi- nationen)	THOMAS (1966)
Abfüllanlage	Moseley-Test	SING et al. (1967)
Tank *	Weihenstephaner Rekontaminationstiter	KREUZER (1978)
Tank	Moseley - Test	BIGALKE (1980)
Tank , Abfüllanlage , Flasche	Psychrotrophenbe- stimmung mit an- schließender Gram- färbung	SCHRÖDER (1984)

* keine weiteren Probenuntersuchungen aus der Produktionslinie

zu entnehmen. Mit der Absicht, Aufschluß über das Rekontaminationsgeschehen im Betrieb zu erhalten, wurden von KLEEBERGER (1976) (Weihenstephaner Rekontaminationstiter) bzw. SUHREN et al. (1980) (Pyruvatdifferenzwert) die Ergebnisse von Produktuntersuchungen hinsichtlich der erfolgten Rekontamination während eines längeren Zeitraums (8 bzw. 7 Monate) als "technologische Fieberkurve" des jeweiligen Betriebes graphisch dargestellt. Den Graphiken ist zu entnehmen, daß sich die Rekontaminationsrate jeweils langsam "aufschaukelte", um dann langsam wieder zurückzugehen. Inwieweit der jeweilige Rekontaminationsrückgang auf korrigierende Eingriffe (Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen) seitens des Betriebes zurückzuführen ist, ist den Arbeiten nicht zu entnehmen.

Um zunehmende Rekontaminationsraten rechtzeitig erkennen und entsprechende Maßnahmen einleiten zu können, empfehlen die Autoren eine regelmäßige Endproduktkontrolle. Der Erfolg der Maßnahmen kann wiederum entsprechend kontrolliert werden. Nach Ansicht von MARSHALL und HARMON (1978) sowie BIGALKE (1980) allerdings stellt die tägliche produktionsbegleitende Untersuchung (im Sinne echter Stufenkontrollen (in-line-sampling)) eine unerläßliche Voraussetzung für die kontinuierliche Produktion von Trinkmilch hoher Qualität mit langer Haltbarkeit dar, da nur mit Hilfe einer derartigen innerbetrieblichen Kontrolle rasches und sicheres Auffinden von Rekontaminationsquellen möglich ist.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Versuchsanordnung

3.1.1 Untersuchungen zur Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Konsummilch

Es sollte festgestellt werden, inwieweit sich der Limulus-Differenz-Titer (TERPLAN et al., 1981) unter Praxisbedingungen für die Vorhersage der Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch eignet. Vergleichend wurde der Weihenstephaner Rekontaminationstiter (KLEEGER, 1976) bzw. der Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium (3.2.1.2.2) bestimmt und zur Haltbarkeit in Beziehung gesetzt. Das Ende der Haltbarkeit wurde durch sensorische Prüfung festgestellt.

Dazu wurden in zwei bayrischen Molkereibetrieben insgesamt 200 Proben pasteurisierter Konsummilch (je Betrieb 100) nach der Herstellung im betriebseigenen Labor untersucht. Jede Probe bestand aus neun Einzelpackungen. Direkt nach der Probenentnahme wurde eine Packung mit dem Limulus-Test (3.2.1.1), mit dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter (3.2.1.2.1) und dem Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium (3.2.1.2.2) untersucht. Eine Packung wurde 24 Stunden bei 20° C gelagert und erneut mit dem Limulus-Test untersucht. Aus der Differenz der beiden Limulustiter wurde der sogenannte Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) gebildet.

Die restlichen sieben Packungen wurden bei 10° C gelagert und das Überschreiten der Haltbarkeit durch tägliche sensorische Prüfung (3.2.2) ermittelt.

3.1.2 Untersuchungen der Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch

Um einen Überblick über den Hygienestatus der pasteurisierten Konsummilch bei der Abfüllung in den beiden Betrieben (A bzw. B) zu erhalten, wurde das gesamte Untersuchungsmaterial (n=200) den jeweiligen Abfüllanlagen (I - X) zugeordnet (3.3.2).

Darüber hinaus wurde in Betrieb B die Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch einer Abfüllanlage durch Endproduktkontrollen während dreier Tagesproduktionen überprüft. Dazu wurden in 2stündigen Abständen je eine Packung als Probe entnommen und der Limulus-Differenz-Titer bestimmt (3.2.1.1).

Vergleichend dazu wurden die Proben wiederum mit dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter (3.2.1.2.1) bzw. mit dem Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium (3.2.1.2.2) untersucht.

Zur Auswertung der Ergebnisse der Tagesproduktion III (3.3.2) wurde der im betriebseigenen Labor routinemäßig festgestellte Colititer mit Zusatz von Bromkresolpurpur (3.2.1.3) nachträglich mit herangezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Bestimmung des LPS-Gehaltes pasteurisierter Konsummilch

Der Limulus-Test wurde im Mikrotiterverfahren nach SÜDI et al. (1981) mit dem "Endotoxin-Test 'Mini'" der Firma Byk-Mallinckrodt durchgeführt. Das Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) liegt gefriergetrocknet in 30 Vertiefungen einer vakuumverpackten Mikrotiterplatte vor.

Die Verdünnung des Untersuchungsmaterials erfolgte entsprechend den Empfehlungen von SÜDI et al. (1981) in Serienverdünnungen

in $10^{0,5}$ er Schritten mit pyrogenfreiem Wasser (Braun, Aqua ad injectabilia). Die Verdünnungsreihen wurden direkt in den leeren Reihen der Mikrotiterplatte angelegt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 30 μ l in die mit LAL beschichteten Kavitäten überführt und gut gemischt. Anschließend wurde die Platte mit Parafilm (American Can Company) übergeklebt und eine Stunde im Wasserbad bei 37° C inkubiert.

Zum Ablesen der Reaktion wurde ein Tropfen 0,2%iger wäßriger Toluidinblau-Lösung (Serva) mit 1% Tween 20 (Serva) zu jeder Kavität gegeben. Um die Gelbildung zu beurteilen, wurde ein an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenes Röhrchen entlang der Seitenwand jeder einzelnen Testkavität eingeführt, das im Falle einer positiven Reaktion ein Stanzloch in das angefärbte Gel saugte. Bei negativer Reaktion wurde die Kavität leerge-saugt. Entstand ein unscharf begrenztes Loch, wobei ca. die Hälfte des Materials abgesaugt wurde, so wurde dies als sogenannte partielle Reaktion beurteilt.

Die visuelle Auswertung erbrachte das Ergebnis in Form eines Titerwertes (Tab. 4). Der Titer ist der Logarithmus des Reziprokwertes der höchsten Verdünnung, in der die Reaktion noch positiv ausfällt. Wurde im Limulus-Test z.B. bei der Verdünnung 1:100 bzw. 10^{-2} , die letzte positive Reaktion, also Gelbildung, beobachtet, so lautet der Titer 2 (siehe JAKSCH, 1983). Im Falle einer partiellen Reaktion ist der abzulesende Titer die Halbstufe zwischen der partiellen und der letzten positiven Reaktion (im Beispiel der Tab. 4 für Probe B 2,25).

Als Standardendotoxin wurde ein Präparat (Byk-Mallinckrodt) eingesetzt, das sich auf den zur Zeit gültigen US-Referenzstandard EC 5 bezieht.

Der LPS-Gehalt einer Probe kann entweder in ng/ml oder in Endotoxineinheiten (EU/ml) ausgedrückt werden. 1 ng EC 5 entspricht 10 EU (Byk-Mallinckrodt). Die Empfindlichkeit des verwendeten Limulus-Amöbozyten-Lysates gegenüber diesem Standardendotoxin betrug 0,6 EU bzw. 0,06 ng LPS/ml.

Tab. 4: Titerbestimmung unter Berücksichtigung der partiellen Reaktion

Probenverdünnungen	Testergebnis			
	Probe A	LAL-Titer	Probe B	LAL-Titer
10^{-1}	+		+	
$10^{-1,5}$	+		+	
10^{-2}	+	2	+	
$10^{-2,5}$	-		±	2,25
10^{-3}	-		-	

Der Endotoxin- bzw. LPS-Gehalt der Probe errechnet sich als Produkt des delogarithmierten Titors und der Empfindlichkeit der Testplatten.

Bei einem Limulustiter von 2 ergibt sich somit ein LPS-Gehalt von $10^2 \times 0,6 = 60$ EU/ml bzw. 6 ng/ml, bei einem Limulustiter von 2,25 ein solcher von $10^{2,25} (= 178) \times 0,6 = 107$ EU/ml bzw. 10,7 ng/ml.

Als Schwankungsbreite der Methode wurde in Mehrfachuntersuchungen (JAKSCH, 1983; SÜDI und HEESCHEN, 1983) eine mögliche Abweichung um einen Titer von 0,25 festgestellt. Nach Angaben von SÜDI und HEESCHEN (1984) ist eine Abweichung um $\pm 0,25$ (Titerstufe) tolerierbar.

3.2.1.2 Ermittlung der Rekontamination von pasteurisierter Konsummilch

3.2.1.2.1 Weihenstephaner Rekontaminationstiter

Der Rekontaminationstiter wurde nach der von KLEEGER (1976) beschriebenen Methode ermittelt. Dazu wurden jeweils drei sterile Reagenzgläser mit 10 ml, 1 ml bzw. 0,1 ml der zu untersuchenden pasteurisierten Konsummilch beschickt und 24 Stunden bei 20° C bebrütet. Von jedem Röhrchen wurde dann eine Öse Material auf einem zu einem Drittel aus Kristallviolett-Galaktose-Agar (Oxoid CM 107) und zwei Dritteln aus "Plate Count Agar" (Oxoid CM 325) zusammengesetzten Nährboden ausgestrichen und wiederum 24 Stunden bei 20° C inkubiert.

Alle Ausstriche mit Bakterienwachstum wurden dann - unabhängig von der Zahl der Kolonien - als positiv bewertet. Aus den Ergebnissen für die drei angesetzten Milchmengen wurde dann eine sogenannte "Indexziffer" gebildet und aus der MPN-Tabelle für einen dreifachen Ansatz die zur Indexziffer gehörige wahrscheinliche Anzahl von Rekontaminationskeimen (= "Rekontaminationstiter") entnommen (DEMETER, 1967).

3.2.1.2.2 Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium

Nach der in 3.2.1.2.1 beschriebenen Methode wurde der Rekontaminationstiter auf dem 1976 von LANGEVELD et al. entwickelten PCBA-Spezialnährmedium (Plate Count Agar (Oxoid CM 325 mit Zusatz von 100 ppm Benzalkon (BAYER))) bestimmt.

3.2.1.3 Bestimmung des Gehaltes an coliformen Keimen

Der Colititer wurde in Brillant-Grün-Galle-Laktose-Lösung, der pro Liter 0,02 g Bromkresolpurpur (Farbindikator) zugegeben waren (vgl. SONDERDRUCK), entsprechend der Arbeitsvorschrift (Coli-Schnelltest-Lösung in Pulverform, Laboratorium MIETH & Co. 68 Mannheim-1) im Rahmen der Routineuntersuchungen vom Betriebspersonal durchgeführt und nachträglich als Interpretationshilfe zur Beurteilung der Tagesproduktion III (3.3.2) mit herangezogen.

3.2.2 Sensorische Prüfung pasteurisierter Konsummilch

Die bei 10° C gelagerte pasteurisierte Konsummilch wurde täglich bei einer Temperatur von 17° C von zwei Prüfpersonen durch Einzelrichten nach dem 5-Punkte-Schema der DLG (1976) sensorisch geprüft.

Es wurde festgelegt, daß eine Probe, die die Qualitätsanforderungen voll erfüllt, mit 5 Punkten zu beurteilen ist; geringfügige Abweichungen entsprachen 4 Punkten; leichte Fehler 3 Punkten; deutliche Fehler 2 Punkten; starke Fehler 1 Punkt und sehr starke Fehler 0 Punkten.

Nach SUHREN et al. (1975) wurde die Haltbarkeitsdauer als überschritten bewertet, wenn die Beurteilung einer Milchprobe 3 Punkte ergab und dies am darauffolgenden Tag bestätigt werden konnte.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Untersuchungen zur Haltbarkeitsvorhersage bei pasteurisierter Konsummilch

Es wurde bei insgesamt 200 Proben pasteurisierter Konsummilch aus zwei Molkereibetrieben der Limulus-Differenz-Titer (TERPLAN et al., 1981) nach Abfüllung der Milch bestimmt. Es sollte überprüft werden, ob sich der Test unter Praxisbedingungen zur Haltbarkeitsvorhersage eignet. Vergleichend wurde der Weihenstephaner Rekontaminationstiter (KLEEBERGER, 1976) bzw. der Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium (3.2.1.2.2) bestimmt und zur sensorisch bestimmten Haltbarkeit der bei 10° C gelagerten Milch in Beziehung gesetzt.

3.3.1.1 Mikrobiologische Untersuchungen

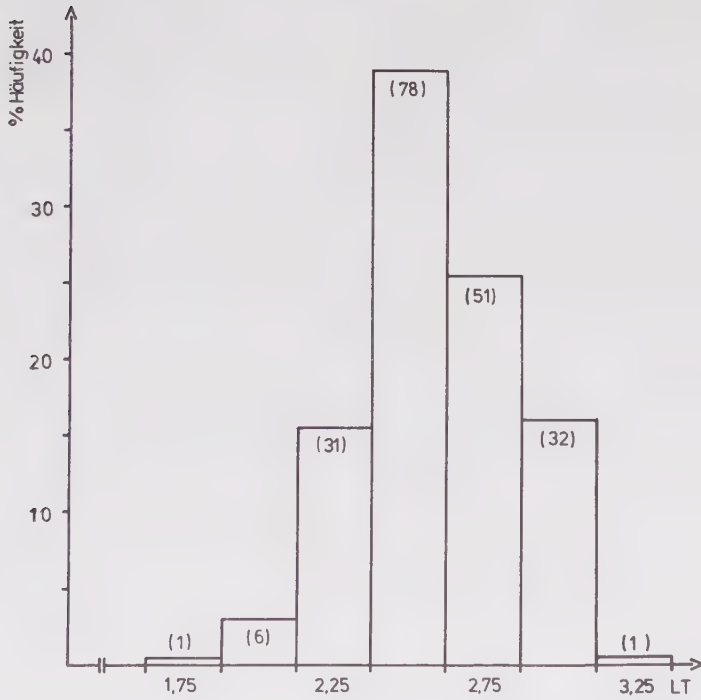
Bei der Ermittlung der für den Differenztitert erforderlichen Ausgangswerte wurden für das gesamte Probenmaterial (n=200) Limulustiter von 1,75 bis 3,25 bzw. LPS-Gehalte von 3,4 ng/ml bis 107 ng/ml festgestellt (Tab. 5). Durchschnittlich enthielten die Proben 23,5 ng LPS/ml (geometrischer Mittelwert).

Aus Tab. 5 und Abb. 4 geht hervor, daß 3,5 % des Untersuchungsmaterials Titer $< 2,25$ (< 11 ng LPS/ml) und nur 16,5 % Titer ≥ 3 (≥ 60 ng LPS/ml) aufwiesen. Die Mehrzahl der Proben (80 %) erbrachte Limulustiter von 2,25 bis 2,75 (11 bis 34 ng LPS/ml). Limulustiter $> 3,25$ bzw. LPS-Gehalte > 107 ng/ml wurden nicht festgestellt.

Tab. 5: LPS-Gehalte bzw. Limulustiter pasteurisierter Konsum-
milch

Herkunft der Proben (n)	Anteil der Proben in % mit LPS-Gehalten in ng/ml (Limulustitern) von						
	3,4 (1,75)	6 (2,00)	11 (2,25)	19 (2,50)	34 (2,75)	60 (3,00)	107 (3,25)
Betrieb A (100)	1	4	24	39	21	10	1
Betrieb B (100)	-	2	7	39	30	22	-
Insgesamt (200)	0,5	3	15,5	39	25,5	16	0,5

Abb. 4: Verteilung der Limulustiter bei 200 Proben
pasteurisierter Konsummilch



Die Ausgangswerte für den Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) in den Betrieben A und B sind den Abb. 5 und 6 bzw. der Tab. 5 zu entnehmen.

In Betrieb A wurden bei 84% der Proben Limulustiter (LT) zwischen 2,25 und 2,75 (11 bis 34 ng LPS/ml) registriert. 5% der Proben wiesen LT < 2,25 (<11 ng LPS/ml) auf, 11% zeigten LT ≥ 3 (60 ng LPS/ml).

In Betrieb B wurden LT zwischen 2 und 3 (6 bis 60 ng LPS/ml) festgestellt, wobei 76% der Proben im Bereich von 2,25 bis 2,75 (11 bis 34 ng LPS/ml) lagen.

Nach 24stündiger Inkubation bei 20° C war im Gesamtmaterial (n = 200) bei 44,5% der Proben (n = 89) kein Anstieg des Limulustiters bzw. bei 16% (n = 32) nur ein Anstieg um 0,25 zu verzeichnen. Der Rest (n = 79) des Untersuchungsmaterials wies Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) von 0,5 bis 2,25 auf (Abb. 7). Ein Abfall des LT war in keiner der Proben festzustellen.

In Betrieb A (n=100) stiegen die LT in 54% der Proben nicht, in 15% der Proben nur um 0,25 an. Die restlichen Proben (31%) waren durch ΔLT_{24} bis 2,25 gekennzeichnet (Abb. 8 und Abb. 10).

In Betrieb B (n=100) war bei 35% der Proben kein Anstieg, in 17% ein Anstieg um 0,25 zu verzeichnen. Die übrigen Proben (48%) wiesen ΔLT_{24} bis 1,75 auf (Abb. 9 und Abb. 10).

Abb. 5: Verteilung der Limulustiter bei pasteurisierter Konsummilch des Betriebes A (n=100)

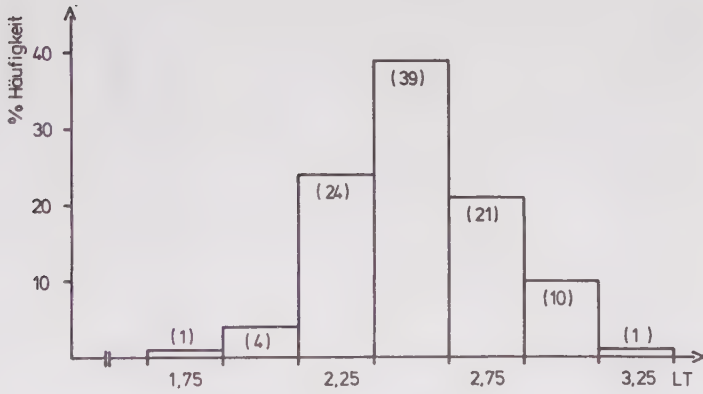


Abb. 6: Verteilung der Limulustiter bei pasteurisierter Konsummilch des Betriebes B (n=100)

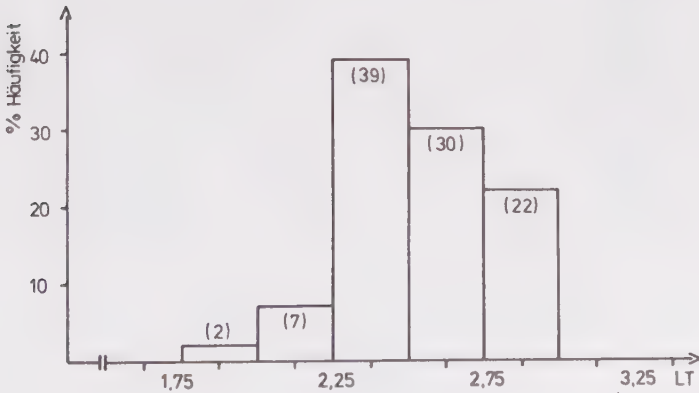


Abb. 7: Verteilung der Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) bei pasteurisierter Konsummilch (n=200)

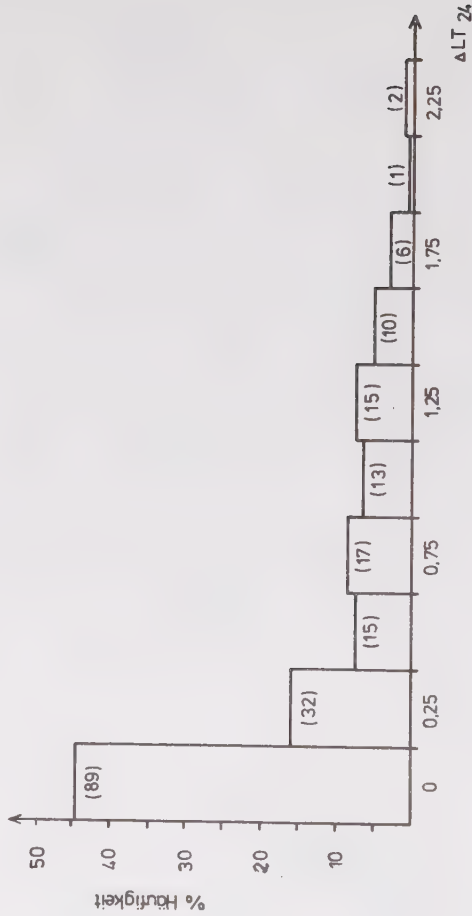


Abb.8 : Verteilung der Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) bei pasteurisierter Konsummilch des Betriebes A ($n=100$)

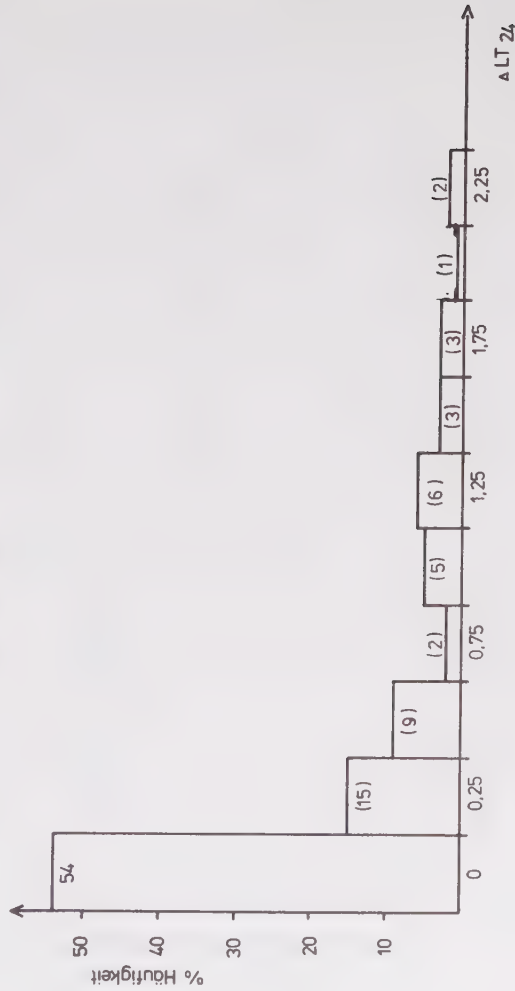


Abb. 9 : Verteilung der Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) bei pasteurisierter Konsummilch des Betriebes B ($n=100$)

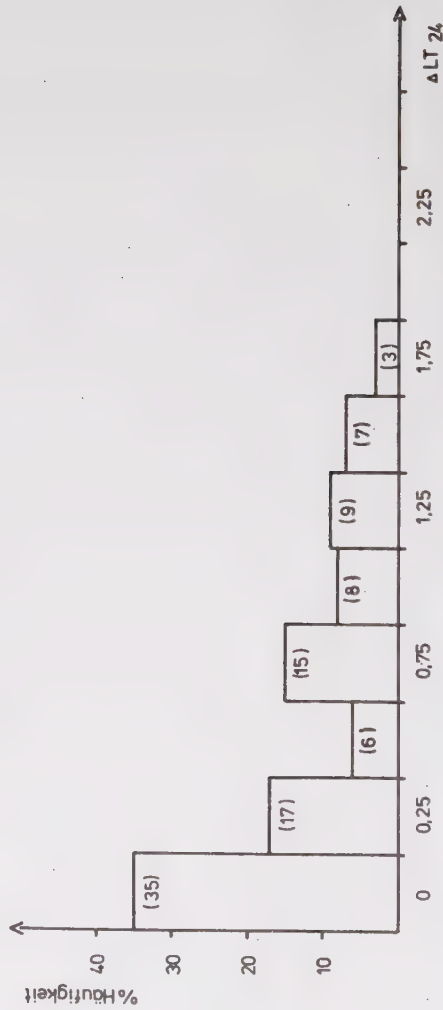
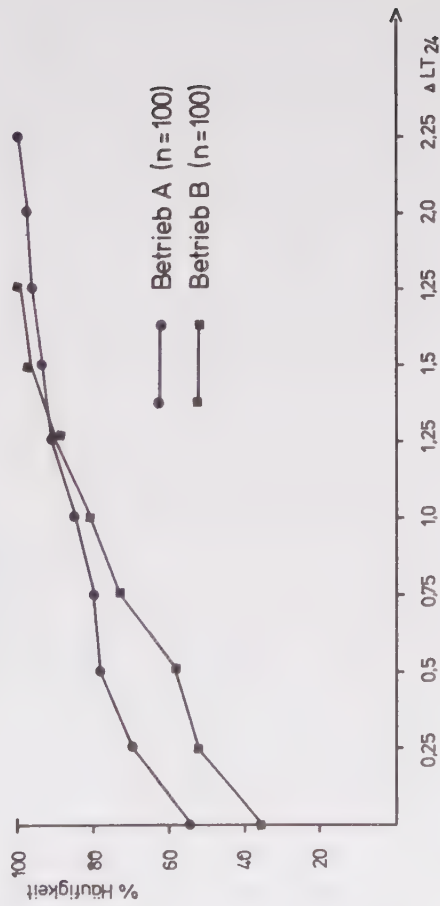


Abb.10 : Summenhäufigkeitsfunktion der Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) von 24 Std. bei 20°C gelagerter pasteurisierter Konsummilch der Betriebe A und B



Die bei der Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Anzahl von Rekontaminationskeimen (Weihenstephaner Rekontaminationstiter) erzielten Resultate sind für das gesamte Probenmaterial (n=200) in Abb. 11 zusammengefaßt.

Bei 13,5% (n=27) der Proben wurde keine Rekontamination nachgewiesen (<3 Keime/100 ml). Andererseits waren in 24% (n=48) der Proben hohe Rekontaminationskeimzahlen mit mehr als 1000 Keimen/100 ml festzustellen. Insgesamt enthielten 32,5% (n=65) der Proben mehr als 100 Rekontaminationskeime/100 ml. In Abb. 12 ist der Gehalt an Rekontaminationskeimen vergleichend für die Betriebe A (n=100) und B (n=100) dargestellt. Während 20 % der Proben des Betriebes A rekontaminationsfrei waren, war dies im Betrieb B nur in 7 % der Fälle festzustellen. Rekontaminationen mit mehr als 100 Keimen/100 ml waren in Betrieb B in 39% der Proben nachzuweisen, wohingegen in Betrieb A nur 26% des untersuchten Materials einen derartig hohen Gehalt an Rekontaminationskeimen aufwiesen. Proben mit 3 bis 100 Keimen/100 ml waren gleichermaßen in den beiden Betrieben für jeweils 54% der Proben festzustellen.

Vergleichend zum Weihenstephaner Rekontaminationstiter wurde die Untersuchungstechnik dieser Methode für das PCBA-Medium (LANGEVELD et al., 1976) angewandt.

Im Gegensatz zum erstgenannten Verfahren erwiesen sich auf diesem Nährboden, auf dem nur gramnegative Keime wachsen (LANGEVELD et al., 1976), 38% der Proben des Gesamtmaterials (n = 200) (Abb. 13) als rekontaminationsfrei (<3 Keime/100 ml), wobei dies für Proben aus dem Betrieb A für 47%, in Betrieb B für nur 29% der Proben der Fall war (Abb. 14). Rekontaminationskeimzahlen von 3 bis 100/100 ml wurden in Betrieb A in 38 % und in Betrieb B in 49 % der Untersuchungen registriert.

Insgesamt (n=200) waren Rekontaminationen > 100 Keime/100 ml bei 18,5% des Untersuchungsmaterials festzustellen. Dabei beinhalteten in Betrieb A nur 15%, in Betrieb B 22% der Proben derartig hohe Gehalte an Rekontaminationskeimen.

Abb.11 : Gehalt an Rekontaminationskeimen (Weihenstephaner Rekontaminationstiter) in pasteurisierter Konsummilch (n=200)

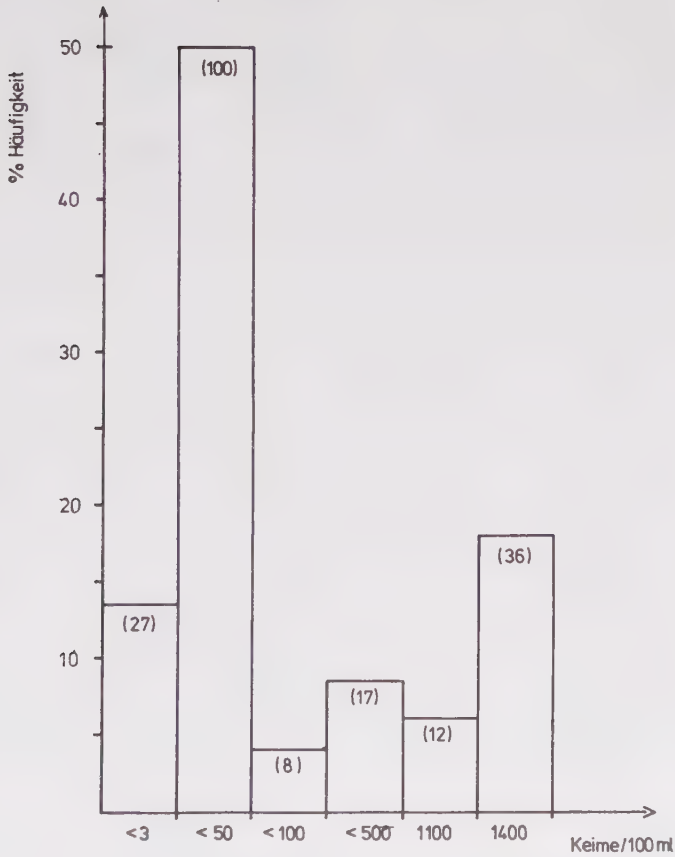


Abb.12: Summenhäufigkeitsfunktion der Gehalte an Rekontaminationskeimen
(Weihenstephaner Rekontaminationstiter) in pasteurisierter Konsum -
milch der Betriebe A und B (n = 200)



Abb.13: Gehalt an Rekontaminationskeimen (PCBA -
Medium) in pasteurisierter Konsummilch
(n = 200)

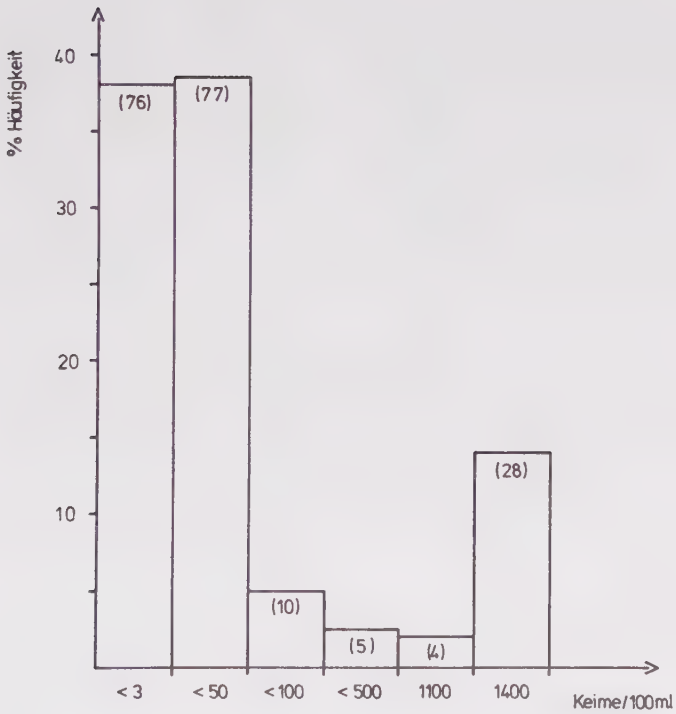
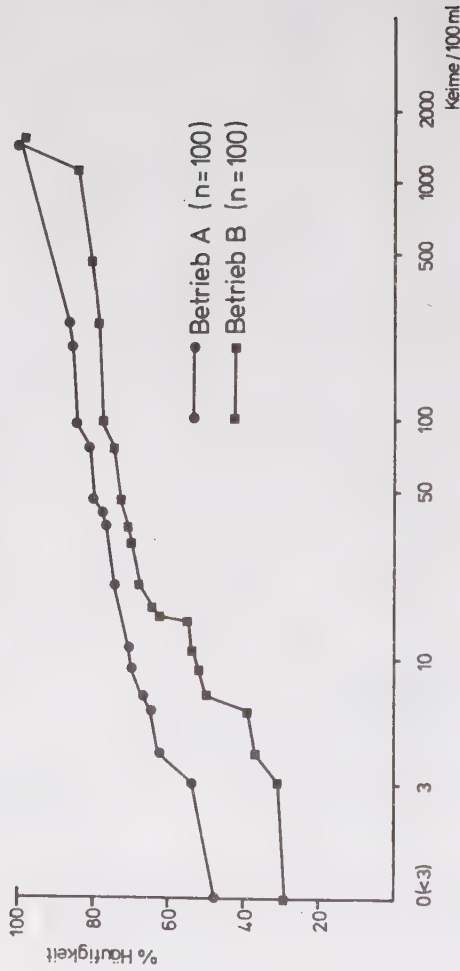


Abb. 14 : Summenhäufigkeitsfunktion der Gehalte an Rekontaminationskeimen (PCBA-Medium) in pasteurierter Konsummilch der Betriebe A und B



Wie aus Tab. 6 hervorgeht, war bei 66% (n=50) der Proben, die sich auf dem PCBA-Medium als rekontaminationsfrei erwiesen hatten (n=76), mit dem Weißenstephaner Rekontaminationstiter Keimwachstum festzustellen. Andererseits war nur bei einer Probe, die mit dem Weißenstephaner Rekontaminationstiter als rekontaminationsfrei erkannt worden war, Keimwachstum auf dem PCBA-Medium zu registrieren.

Insgesamt wurde - bei Zugrundelegen der gewählten Klasseneinteilung - in 108 Fällen (54%) Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Weißenstephaner Rekontaminationstiters und jenen auf dem PCBA-Medium festgestellt. Bei 88 Untersuchungen (44%) wurden mit dem Weißenstephaner Rekontaminationstiter höhere Gehalte an Rekontaminationskeimen gefunden als mit dem Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium (vgl. Abb. 15). Nur in vier Fällen (2%) zeigte der Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium höhere Keimgehalte an als der Weißenstephaner Rekontaminationstiter.

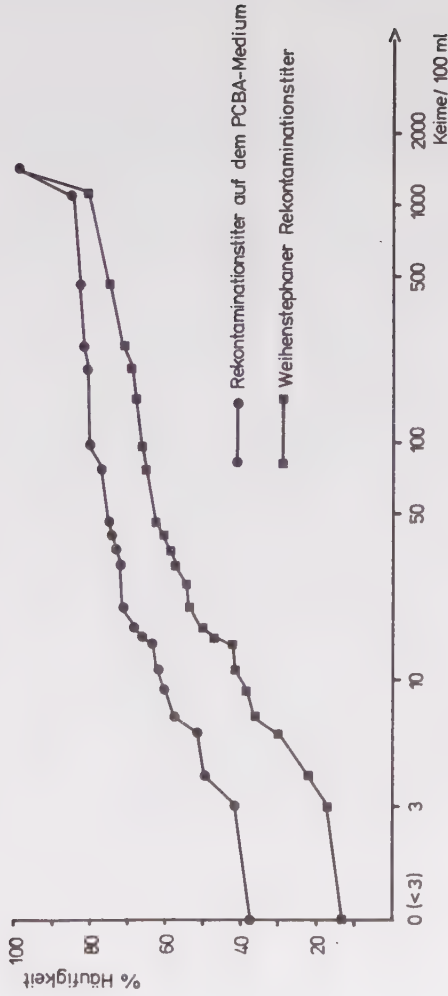
Innerhalb der gewählten Klassen (vgl. Tab. 6) sind bezüglich der Einzelergebnisse geringgradige Unterschiede zwischen den Resultaten der beiden Verfahren zu verzeichnen. So zeigte der Weißenstephaner Rekontaminationstiter in 58,5% der Untersuchungen höhere Gehalte an Rekontaminationskeimen an, während bei nur 5% der Proben auf dem PCBA-Medium höhere Keimzahlen registriert wurden.

Nur bei einer der letztgenannten Proben betrug die Keimzahl-differenz 300 Keime/100 ml (bei 4 Proben <10, bei 5 Proben <25 Keime/100 ml); allerdings wurden in diesem Fall mit beiden Verfahren hohe Gehalte an Rekontaminationskeimen (1100 bzw. 1400/100 ml) nachgewiesen.

Tab. 6 : Vergleich des Weihenstephaner Rekontaminationstitors mit dem Rekontaminationstitor auf dem PCBA-Medium bei 200 Proben pasteurisierter Konsummilch

Weihenstepha- ner Rekonta- minationstitor Keime/100 ml	Rekontaminationstitor auf dem PCBA-Medium Keime / 100 ml										Proben insges.
	0 (<3)	≤ 25	≤ 45	≤ 95	≤ 150	≤ 250	≤ 450	1100	1400		
0 (<3)	26	1									27
≤ 25	37	44	2								83
≤ 45	5	10	2								17
≤ 95	1	1	2	4							8
≤ 150	1	2									3
≤ 250	3		3			1					7
≤ 450		1		5			1				7
1100	1	3	1			2	1	3	1		12
1400	2	5		1				1	27		36
Proben insges.	76	67	10	10		3	2	4	28		200

Abb. 15 : Summenhäufigkeitsfunktion der Weihenstephaner Rekontaminationstiter bzw. der Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium bei pasteurisierter Konsummilch (n=200)



Beim Vergleich der Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) mit den Ergebnissen des Weihenstephaner Rekontaminationstiters (WRT) bzw. jenen des Rekontaminationstiters auf dem PCBA-Medium fällt auf, daß bei gleichen ΔLT_{24} mit dem WRT höhere Gehalte an Rekontaminationskeimen nachgewiesen wurden als mit dem Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium (vgl. Tab. 7 und 8).

Von 121 Proben mit $\Delta LT_{24} \leq 0,25$ waren 69 auf dem PCBA-Medium rekontaminationsfrei, 48 Proben enthielten ≤ 25 Keime/100 ml. Nur bei vier Proben wurden höhere Gehalte an Rekontaminationskeimen (30, 35, 40, 200/100 ml) festgestellt. Demgegenüber erwiesen sich bei der Untersuchung mit dem WRT nur 27 Proben als rekontaminationsfrei. Bei den übrigen Proben wurden Keimzahlen bis zu 1400/100 ml registriert.

Proben ($n=47$), die bei der Untersuchung auf dem PCBA-Medium Rekontaminationskeimgehalte $>45/100$ ml enthielten (Tab. 7), erbrachten mit Ausnahme von fünf Proben $\Delta LT_{24} \geq 1$; dagegen waren von 73 Proben, in denen mit dem WRT >45 Keime/100 ml nachgewiesen worden waren (Tab. 8), 27 Proben durch $\Delta LT_{24} < 1$ gekennzeichnet.

Tab. 7 : Vergleich der Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) und der Gehalte an Rekontaminationskeimen (PCBA-Medium) bei pasteurisierter Konsummilch (n=200)

ΔLT_{24}	Anzahl der Proben mit Keimen / 100 ml										Proben
	0 (<3)	≤ 25	≤ 45	≤ 95	≤ 150	≤ 250	≤ 450	1100	1400	insges.	
0	54	33	1			1				89	
0,25	15	15	2							32	
0,5	5	7	2						1	15	
0,75	2	9	3					2	1	17	
1,0		1	1	5			1	1	4	13	
1,25				4		1		1	9	15	
1,5		1	1	1		1			6	10	
1,75		1					1		4	6	
2,0									1	1	
2,25									2	2	
Proben insges.	76	67	10	10		3	2	4	28	200	

Tab. 8 : Vergleich der Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) und der Gehalte an Rekontaminationskeimen (Weihenstephaner Rekontaminationstiter) bei pasteurisierter Konsummilch (n=200)

ΔLT_{24}	Anzahl der Proben mit Keimen / 100 ml											Proben insges.
	0 (<3)	≤ 25	≤ 45	≤ 95	≤ 150	≤ 250	≤ 450	1100	1400			
0	24	44	11		1	2		3	4			89
0,25	3	23	1	2		1		1	1			32
0,5		8	3		1	1		1	1			15
0,75		8	1	1	1	2		1	3			17
1,0			1	2			5	2	3			13
1,25				1			2	2	10			15
1,5				2		1			7			10
1,75								2	4			6
2,0									1			1
2,25									2			2
Proben insges.	27	83	17	8	3	7	7	12	36			200

3.3.1.2 Sensorische Untersuchungen

Die sensorisch ermittelte Haltbarkeitsdauer der bei 10°C gelagerten Konsummilch reichte von 2 bis 6 Tagen. Wie aus Abb. 16 hervorgeht waren die Proben größtenteils 3 bis 4 Tage (24,5% bzw. 43,5%) haltbar. Bei 15,5 % der Proben waren Geschmacksabweichungen bereits nach 2 Tagen festzustellen. Eine Haltbarkeit von 5 bis 6 Tagen konnte insgesamt 16,5% des Untersuchungsmaterials zugeordnet werden.

Die durchschnittliche Haltbarkeit der Proben aus den Betrieben A und B ist den Abb. 17 und 18 zu entnehmen. 66% der Proben aus Betrieb A waren 4 bzw. 5 Tage ohne Geschmacksabweichung. In Betrieb B waren 54% der Proben 4 Tage und länger haltbar, wobei eine Probe eine Haltbarkeitsdauer von 6 Tagen erreichte.

Abb.16 : Verteilung der Haltbarkeit bei 10°C gelagerter pasteurisierter Konsummilch (n=200)

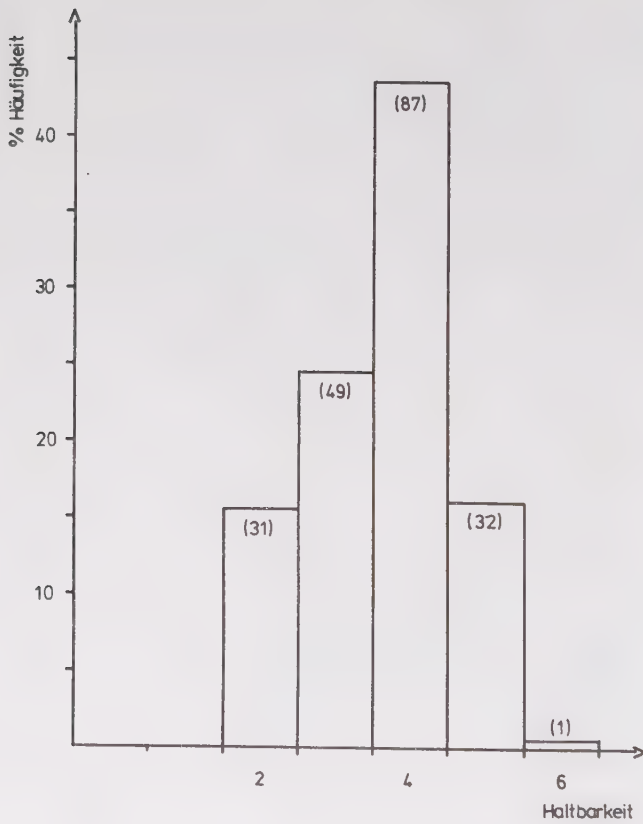


Abb.17 : Verteilung der Haltbarkeit bei 10°C gelagerter pasteurisierter Konsummilch des Betriebes A (n = 100)

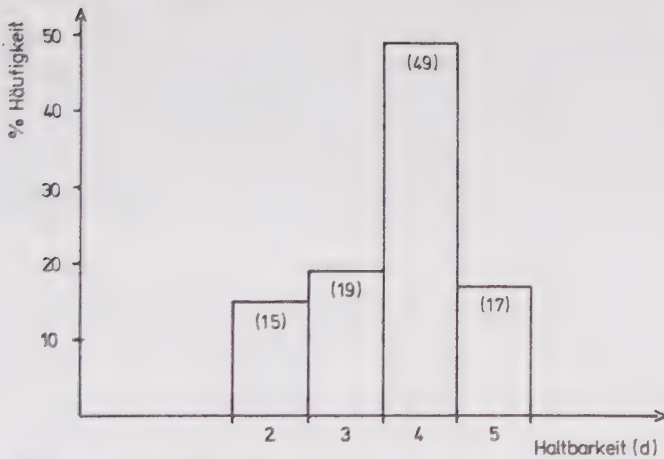
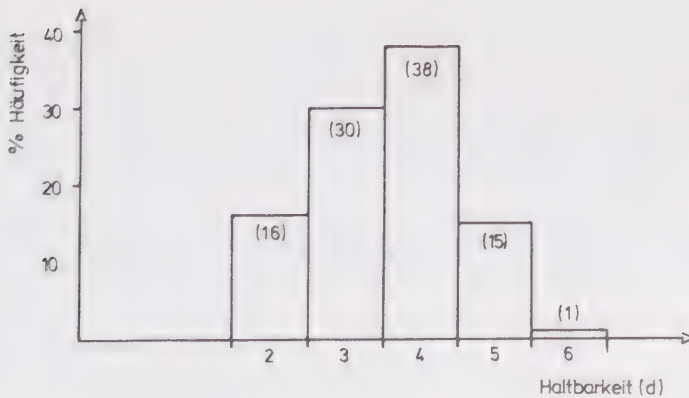


Abb.18 : Verteilung der Haltbarkeit bei 10°C gelagerter pasteurisierter Konsummilch des Betriebes B (n = 100)



3.3.1.3 Beziehungen zwischen den mikrobiologischen Befunden und der Haltbarkeit bei pasteurisierter Konsummilch

Die Beziehungen der Haltbarkeit der bei 10° C gelagerten pasteurisierten Konsummilch zum Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) sind in Tab. 9 dargestellt. Daraus geht hervor, daß mit steigendem ΔLT_{24} die Haltbarkeit abnimmt und Proben mit $\Delta LT_{24} \geq 1$ niemals länger als 3 Tage haltbar waren. Dementsprechend wurde auch bei der Berechnung der durchschnittlichen ΔLT_{24} (Tab. 10) für Proben mit kurzer Haltbarkeitsdauer (≤ 3 Tage) ein ΔLT_{24} von ca. 1 ermittelt; Proben mit langer Haltbarkeit (> 3 Tage) dagegen zeigten keinen Anstieg der Limulus-Differenz-Titer.

Proben mit hohen Gehalten an Rekontaminationskeimen auf dem PCBA-Medium (Tab. 11) war überwiegend kurze Haltbarkeit (≤ 3 Tage) zuzuordnen, wohingegen rekontaminationsfreie Proben bzw. Proben mit einer geringen Anzahl an Rekontaminationskeimen ($< 10/100$ ml) meist länger als 3 Tage haltbar waren.

Dies gilt weitgehend auch für den Weihenstephaner Rekontaminationstiter (Tab. 12); allerdings wurden mit diesem Verfahren auch für Proben mit einer längeren Haltbarkeitsdauer (> 3 Tage) zum Teil hohe Gehalte an Rekontaminationskeimen festgestellt.

Um die Aussagekraft der drei Verfahren für die Voraussage der Haltbarkeit von pasteurisierter Konsummilch beurteilen zu können, wurden die Untersuchungsergebnisse in Anlehnung an Literaturangaben in drei Klassen unterteilt, und zwar für den Limulus-Differenz-Titer nach JAKSCH (1983), für den Weihenstephaner Rekontaminationstiter sowie den Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium nach KLEEBERGER (1976) und mit der sensorisch bestimmten Haltbarkeit in Beziehung gesetzt.

Aus Abb. 19 und Tab. 13 geht hervor, daß die Ergebnisse des Limulus-Differenz-Titers und des Rekontaminationstiters auf

dem PCBA-Medium in ihrer Beziehung zur Haltbarkeit gut übereinstimmen. Vor allem im Bereich starker Rekontaminationen ($\Delta LT_{24} \geq 1$ und Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium > 100 Keime/100 ml) unterscheiden sich diese beiden Verfahren von den vergleichbaren Ergebnissen des Weihenstephaner Rekontaminationstiters.

Wird die Standardabweichung ($\pm s$) in die Beurteilung der drei zu prüfenden Parameter miteinbezogen (Abb. 19), so ist zwischen der Haltbarkeitsdauer von Proben mit $\Delta LT_{24} < 1$ bzw. Rekontaminationskeimzahlen auf dem PCBA-Medium $\leq 100/100$ ml einerseits und jenen mit $\Delta LT_{24} \geq 1$ bzw. > 100 Keimen/100 ml keine Überschneidung festzustellen.

Bei den mit dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter registrierten Resultaten ist allerdings zwischen der Haltbarkeitsdauer für Proben mit ≤ 100 Rekontaminationskeimen/100 ml und jenen mit > 100 Keimen/100 ml nicht deutlich zu unterscheiden. Auch bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten für die Beziehung zwischen der Haltbarkeitsdauer pasteurisierter Konsummilch und den drei Parametern war für den Limulus-Differenz-Titer und den Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium eine engere Beziehung zur Haltbarkeit als für den Weihenstephaner Rekontaminationstiter festzustellen.

Im einzelnen wurden folgende Werte errechnet:

$r = - 0,73$ (Limulus-Differenz-Titer)

$r = - 0,67$ (Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium)

$r = - 0,55$ (Weihenstephaner Rekontaminationstiter)

Die Beziehung zur Haltbarkeit der bei $10^{\circ}C$ gelagerten pasteurisierter Konsummilch war für alle drei Parameter mit $p < 0,001$ statistisch gesichert.

Tab. 9 : Beziehung zwischen Haltbarkeitsdauer und Limulus - Differenz-Titer (ΔLT_{24}) von pasteurisierter Konsummilch (n = 200)

Haltbarkeitsdauer (d)	Anzahl der Proben mit ΔLT_{24} von										Proben insgesamt
1	0	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5	1,75	2,0	2,25	
2						6	11	7	4	1	2
3	13	5	5	10	7	4	3	2			31
4	51	22	7	7							49
5	24	5	3								87
6	1										32
Proben insgesamt	89	32	15	17	13	15	10	6	1	2	200

Tab.10 : Durchschnittliche Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) bei pasteurisierter Konsummilch unterschiedlicher Haltbarkeit (n = 200)

Haltbarkeits- dauer (d)	Anzahl der Proben (n)	ΔLT_{24} $\bar{x}$ (s)
≤ 3	80	0,94 (0,59)
> 3	120	0,14 (0,21)

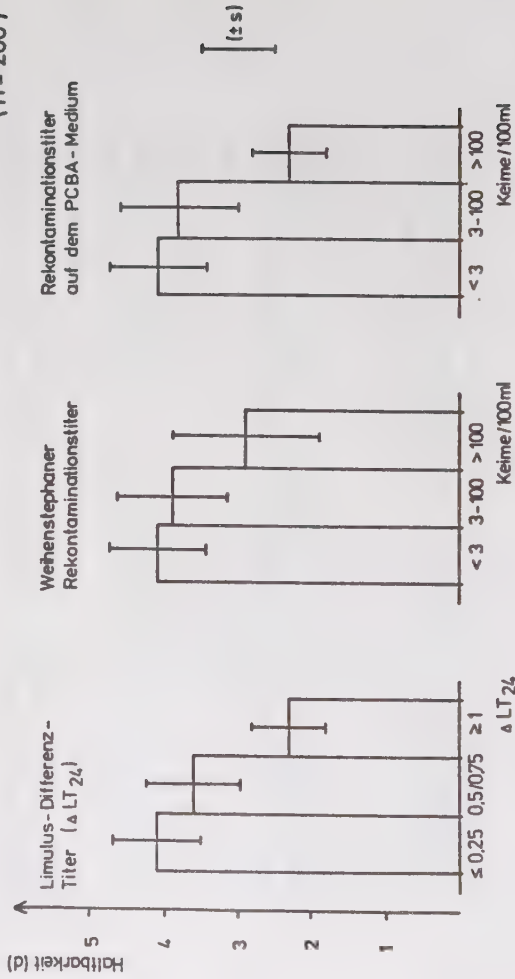
Tab.11 : Beziehung zwischen Haltbarkeitsdauer und den Gehalten an Rekontaminationskeimen auf dem PCBA-Medium bei pasteurisierter Konsummilch (n=200)

Haltbarkeitsdauer (d)	Anzahl der Proben mit Keimen / 100 ml						Proben insges.
	< 3	< 10	< 100	< 500	1100	1400	
1							
2			5	1	1	24	31
3	14	8	17	3	3	4	49
4	43	29	14	1			87
5	18	9	5				32
6	1						1
Proben insgesamt	76	46	41	5	4	28	200

Tab.12: Beziehung zwischen Haltbarkeitsdauer und den Gehalten an Rekontaminationskeimen (Weihenstephaner Rekontaminations-titer) bei pasteurisierter Konsummilch (n = 200)

Haltbarkeitsdauer in Tagen	Anzahl der Proben mit Keimen / 100 ml						Proben insges.
	<3	<10	<100	<500	1100	1400	
1							
2			4	1	1	25	31
3	5	10	13	9	7	5	49
4	14	32	30	5	3	3	87
5	8	8	10	2	1	3	32
6		1					1
Proben insgesamt	27	51	57	17	12	36	200

Abb. 19 : Beziehung zwischen sensorisch bestimmter Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch und Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}), Weihenstephaner Rekontaminationstiter bzw. Rekontaminations titer auf dem PCBA-Medium ($n = 200$)



Tab.13: Beziehungen zwischen der Haltbarkeitsdauer von pasteurisierter Konsummilch und Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}), Weihenstephaner Rekontaminationstiter bzw. Rekontaminations-titer auf dem PCBA-Medium (n=200)

	Anzahl der Proben mit einer Haltbarkeit (d) von	
	≤ 3	> 3
ΔLT_{24}		
$\leq 0,25$	18	103
0,5 / 0,75	15	17
≥ 1	47	—
Weihenstephaner Rekontaminationstiter		
Keime / 100 ml		
< 3	5	22
3-10	10	41
11-100	17	40
> 100	48	17
Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium		
Keime / 100 ml		
< 3	14	62
3-10	8	38
11-100	22	19
> 100	36	1

3.3.2 Untersuchungen der Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch

Die pasteurisierte Konsummilch wurde in den Betrieben A und B jeweils mittels 5 Abfüllanlagen abgepackt.

Die durchschnittlichen Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) der bei den einzelnen Abfüllanlagen entnommenen Proben sind der Abb. 20 zu entnehmen.

Während in Betrieb A vier Abfüllanlagen (I - IV) weitgehend rekontaminationsfrei arbeiteten, war dies bei einer Anlage (V) nicht gewährleistet; 71% der Proben dieser Abfüllanlage waren durch $\Delta LT_{24} \geq 1$ gekennzeichnet (Tab. 14 und Abb. 23).

In Betrieb B (Tab. 14 und Abb. 23) war einerseits der Probenanteil mit $\Delta LT_{24} \leq 0,25$ geringer als im Betrieb A (Abb. 21 und 22), andererseits wurden im erstgenannten Betrieb häufiger $\Delta LT_{24} \geq 1$ registriert. Derartig hohe ΔLT_{24} blieben im Betrieb A überwiegend auf Proben der Anlage V beschränkt, während sie in Betrieb B mehrfach in Proben aller Abfüllanlagen festgestellt wurden. In Abb. 23 sind beispielhaft die ΔLT_{24} zweier Abfüllanlagen dargestellt. Während die Anlage IV i.d.R. rekontaminationsfrei arbeitete, waren bei der Abfüllanlage V überwiegend $\Delta LT_{24} \geq 1$ festzustellen, dementsprechend verhielt sich auch der Gehalt an Rekontaminationskeimen auf dem PCBA-Medium (Abb. 24).

Den Abb. 21 und 22 bzw. 25 und 26 ist zu entnehmen, daß der Nachweis von Rekontaminationskeimen mit dem Limulus-Differenz-Titer mit den Ergebnissen des Rekontaminationstiters auf dem PCBA-Medium für alle Abfüllanlagen im wesentlichen übereinstimmt.

Tab.14 : Beziehung zwischen dem Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) und der Haltbarkeitsdauer (d) bei 10°C gelagerter pasteurisierter Konsummilch aus verschiedenen Abfüllanlagen der Betriebe A und B

		Abfüllanlagen (I – X) und Haltbarkeit (d)																		Proben insges.							
		I			II			III			IV			V													
		2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6		2	3		4	5	6				
	$\Delta L T_{24}$	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6						
Betrieb A (n = 100)	$\leq 0,25$	-	1	13	2	-	-	2	10	4	-	-	3	9	3	-	-	4	10	4	-	-	1	2	1	-	69
	0,5/0,75	-	-	1	-	-	-	2	1	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	11
	≥ 1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	14	1	-	-	-	20
Betrieb B (n = 100)	$\leq 0,25$	-	1	6	1	-	-	2	4	1	-	-	4	8	7	-	-	-	7	4	1	-	-	4	2	-	52
	0,5/0,75	-	4	2	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	3	-	-	-	1	4	-	21	
	≥ 1	2	6	-	-	-	-	2	2	-	-	-	3	-	-	-	-	4	1	-	-	-	5	2	-	-	27

Abb. 20 : Durchschnittliche Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) pasteurisierter Konsummilch aus unterschiedlichen Abfüllanlagen der Betriebe A und B

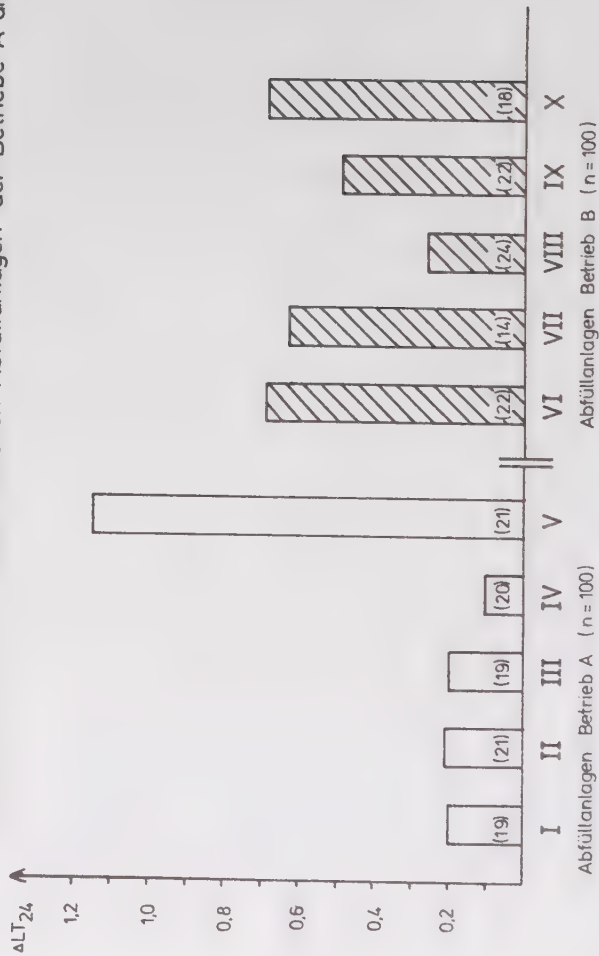


Abb. 21 Summenbedarfsfunktion der Limites Differenz-Tiere (ΔU_{20})
 von postdefurierter Kossammich aus unterschiedlichen
 Abfüllungen des Betreffes A



Abb. 22: Summenhäufigkeitsfunktion der Limulus - Differenz - Titer (ΔLT_{24})
von pasteurisierter Konsummilch aus unterschiedlichen
Abfüllanlagen des Betriebes B

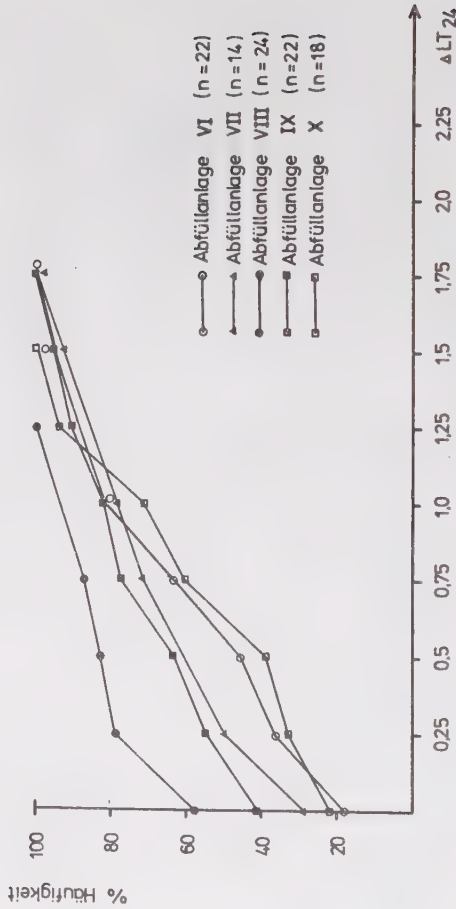


Abb. 23 : Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}) von pasteurisierter Konsummilch der Abfüllanlagen IV und V des Betriebes A

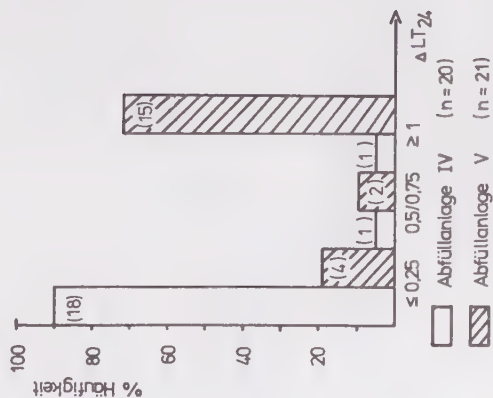


Abb. 24 : Gehalt an Rekontaminationskeimen in pasteurisierter Konsummilch (PCBA-Medium) der Abfüllanlagen IV und V des Betriebes A

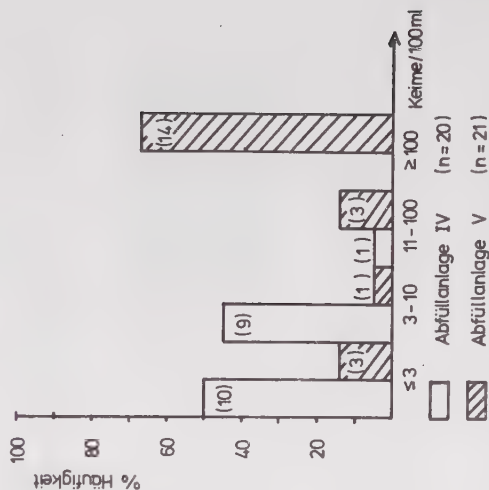


Abb. 25 : Summenhäufigkeitsfunktion der Gehalte an Rekontaminationskeimen (PCBA-Medium) in pasteurisierter Konsummilch der Abfüllanlagen des Betriebes A



Abb. 26: Summenhäufigkeitsfunktion der Gehalte an Rekontaminationskeimen (PCBA-Medium) in pasteurisierter Konsummilch der Abfüllanlagen des Betriebes B



In Betrieb B wurden als orientierende Versuche Endproduktkontrollen während dreier Tagesproduktionen (3.1.2) durchgeführt.

Dabei zeigten sich bei den Endproduktkontrollen I und II (Tab. 15 und 16) bei Produktionsbeginn ΔLT_{24} von 2,0 bzw. 1,75. Alle weiteren Proben, die jeweils im Abstand von 2 Stunden entnommen wurden, erwiesen sich bei der Endproduktkontrolle I als rekontaminationsfrei bzw. erbrachten ΔLT_{24} von 0,5 (Endproduktkontrolle II).

Anders stellte sich die Situation bei der Endproduktkontrolle III (Tab. 17) dar. Hier wurden über 6 Stunden hinweg (4 Proben) $\Delta LT_{24} \geq 2$ festgestellt. Der zugehörige Tank I wies noch in 0,1 ml positiven Colititer (3.2.1.3) auf. Nach Vorschalten von Tank II (Colititer negativ) sanken die ΔLT_{24} der weiteren Proben auf 1,0 bzw. 0,75.

Für alle Endproduktkontrollen während der drei Tagesproduktionen zeigten die Ergebnisse der ΔLT_{24} mit den Gehalten an Rekontaminationskeimen (Weihenstephaner Rekontaminationstiter bzw. Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium) weitgehende Übereinstimmung.

Tab. 15 : Überprüfung der Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch während der Tagesproduktion einer Abfüllanlage des Betriebes B (Endproduktkontrolle I)

		Ergebnisse der Untersuchung abgepackter pasteurisierter Konsummilch		Pasteurisierte Konsummilch im Vorlauftank
Probennummer und Zeit der Probenahme	Limulus-Differenz-Titer (Δ LT)	Weihenstephaner (VRB/PC)	Rekontaminationstiter (Keime/100 ml) (PCBA-Medium)	Negativer Coliformtiter ... (ml)
1	7 [∞]	250	250	1
2	9 [∞]	25	0	
3	11 [∞]	15	4	
4	13 [∞] x	200	6	

x Produktionsende

Tab. 16 : Überprüfung der Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch während der Tagesproduktion einer Abfüllanlage des Betriebes B (Endproduktkontrolle II)

		Ergebnisse der Untersuchung abgepackter pasteurisierter Konsummilch		Pasteurisierte Konsummilch im Vorlauftank
Probennummer und Zeit der Probenahme	Limulus-Differenz-Titer (Δ LT)	Weihenstephaner Keime / 100 ml (VRB/PC)	Rekontaminationstiter (PCBA-Medium)	Negativer Coliformtiter ... (ml)
1 7 30	1,75	1400	1400	1
2 9 30	0,5	4	0	
3 11 30	0,5	20	7	
4 13 30	0,5	7	0	
5 17 30	0,5	3	7	
6 18 40 x	0,5	4	7	

x Produktionsende

Tab. 17 : Überprüfung der Produktionshygiene bei der Abfüllung pasteurisierter Konsummilch während der Tagesproduktion einer Abfüllanlage des Betriebes B (Endproduktkontrolle III)

Probennummer und Zeit der Probenahme	Ergebnisse der Untersuchung abgepackter pasteurisierter Konsummilch			Pasteurisierte Konsummilch im Vorlauftank
	Limulus - Differenz- Titer (ΔLT_{24})	Weihenstephaner (VRB/PC)	Rekontaminationstiter (Keime / 100 ml) (PCBA-Medium)	Negativer Coliformtiter ... (ml)
1 7 ⁰⁰	2,25	1400	1400	Tank I 0,01
2 9 ⁰⁰	2,0	1400	1400	
3 11 ⁰⁰	2,0	1400	1400	
4 13 ⁰⁰	2,0	1400	1400	
5 15 ⁰⁰	1,0	7	7	Tank II 1
6 15 ⁴⁵	0,75	7	3	

x Produktionsende

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Die mikrobiologische Beschaffenheit der Rohmilch hängt ab von der hygienischen Sorgfalt, mit der sie bei Transport und Lagerung vom Erzeugerbetrieb bis zur Wärmebehandlung im Verarbeitungsbetrieb behandelt wird (BRANDL, 1968; DURCE und THOMAS, 1972; FLÜCKINGER, 1981; PALMER, 1981; STADHOUDERS, 1982). Dabei spielen die psychrotrophen gramnegativen Keime, die sich auch unter Kühlbedingungen vermehren können, eine besondere Rolle (LANGEVELD und CUPERUS, 1980; HEESCHEN et al., 1981; TOLLE und SUHREN, 1982). Die gramnegativen Keime werden zwar bei der Pasteurisierung mit Ausnahme von *Alcaligenes tolerans* abgetötet (PETTE, 1962; STADHOUDERS, 1972; KLEEBERGER, 1976; LANGEVELD et al., 1976), doch können hitzeresistente Enzyme, z.B. Lipasen und Proteasen die Wärmebehandlung z.T. überstehen und auch nach der Hitzebehandlung, insbesondere bei längere Zeit gelagerten Produkten, wie UHT-Milch (LAW et al., 1977; GEBRE-EGZIABHER et al., 1980; BLANKENAGEL, 1982) oder Käse (DRIESSEN und STADHOUDERS, 1975; DEETH und FITZGERALD, 1976; COUSIN und MARTH, 1977; GINZINGER, 1981), die Qualität beeinflussen. Darüber hinaus können Metabolite der gramnegativen psychrotrophen Rohmilchflora Rekontaminationskeime in ihrem Wachstum stimulieren und so zu einer Qualitäts- bzw. Haltbarkeitsverminderung des Produktes beitragen (KIELWEIN et al., 1978; SUHREN et al., 1979; TOLLE und SUHREN, 1982; WINTERER, 1982).

Die Haltbarkeit rekontaminationsfrei abgefüllter kühlgelagerter pasteurisierter Milch wird durch die Stoffwechselaktivität thermodururer Keime begrenzt, die sich unter Kühlbedingungen nur langsam vermehren bzw. nur in geringem Maße stoffwechselaktiv sind (BRANDL, 1968; BUSSE, 1975a; KLEEBERGER, 1978; TOLLE et al., 1981). Meistens allerdings wird die Haltbarkeit pasteurisierter Milch durch gramnegative psychrotrophe Keime bedingt (LANGEVELD et al., 1973; KLEEBERGER, 1976; SUHREN et al., 1979 und 1980; HEESCHEN et al., 1981; COUSIN, 1982; TOLLE und SUHREN, 1982; BOSSUYT und WAES, 1983; SCHRÖDER, 1984).

Durch Schäden oder konstruktionsbedingte Mängel im Leitungs- und Behältersystem, das die Milch zwischen Hitzebehandlung und Abfüllung durchläuft, gelangen derartige Rekontaminationskeime in die bereits wärmebehandelte Milch (MROZEK, 1970; LIMMER, 1979; BIGALKE, 1980; DREWS et al., 1983). In nährstoffhaltigen Ablagerungen, welche besonders in schlecht zu reinigenden und desinfizierenden Toträumen (Dreiwegehähne, T-Stücke), an schadhafte Oberflächen sowie eingebauten Misch-, Meß- und Steuervorrichtungen entstehen, können sich Rekontaminationskeime ansiedeln und anreichern.

Der Abfüllanlage mit ihren vielen, schwer zu reinigenden und desinfizierenden beweglichen Teilen kommt besondere Bedeutung als Rekontaminationsquelle zu (THOMAS, 1966; SING et al., 1967; MROZEK, 1970; LIMMER und SCHEDDIN, 1978; MOSELEY, 1980; SCHRÖDER, 1984). Fließweginfektionen (Kondenswasser) und Produktverschmierungen begünstigen Ansiedlung, Anreicherung und Verteilung von Rekontaminationskeimen über die gesamte Abfüllanlage und damit verbunden die ständige Rekontamination des Produktes. Abfüllvorrichtungen und -verfahren bergen darüber hinaus die Gefahr der Kontamination über die Betriebsraumluft sowie durch evtl. kontaminiertes Verpackungsmaterial (BOCKELMANN, 1973, VÖGELE, 1978, DREWS et al., 1983).

Die kontinuierliche Produktion von pasteurisierter Konsummilch hoher Qualität mit langer Haltbarkeit kann durch regelmäßige Endproduktkontrolle (KLEEGER, 1976; SUHREN et al., 1980), zuverlässiger allerdings durch tägliche produktionsbegleitende Untersuchungen, abgesichert werden (MARSHALL und HARMON, 1978; BIGALKE, 1980). Derartige Untersuchungen ermöglichen ein schnelles und sicheres Auffinden von Rekontaminationskeimen.

Voraussetzung dafür sind empfindliche Untersuchungsmethoden, mit denen gramnegative psychrotrophe Rekontaminationskeime, die direkt nach der Hitzebehandlung meist nur in sehr geringer Anzahl in pasteurisierter Milch vorliegen, spezifisch erfaßt werden können und deren Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit

vorliegen. Mit dem Limulus-Test besteht die Möglichkeit, durch Bestimmung des LPS-Gehaltes auch noch nach einer Wärmebehandlung die Belastung der Rohmilch mit gramnegativen Keimen abzuschätzen (TERPLAN et al., 1975 und 1981; ZAADHOF und TERPLAN, 1981; SÜDI et al., 1981, 1982; SÜDI und HEESCHEN, 1983 und 1984; BIRKELAND et al., 1983; HEESCHEN et al., 1984; RONDINI et al., 1984) sowie mit Hilfe des Limulus-Differenz-Titers (TERPLAN et al., 1981) innerhalb von 24 Std. eine Aussage über die Rekontamination des Produktes zu treffen bzw. dessen Haltbarkeit vorherzusagen.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die bislang nur in begrenztem Umfang vorliegenden Informationen über den LPS-Gehalt frisch pasteurisierter Konsummilch zu ergänzen, um auf der Grundlage eines umfangreicheren Probenmaterials zuverlässigere Aussagen über die Belastung der Rohmilch mit gramnegativen Keimen vor der Hitzebehandlung zu ermöglichen. In Endproduktkontrollen anhand des Limulus-Differenz-Titers sollten Rekontaminationen mit gramnegativen psychrotrophen Keimen erfaßt und die Eignung des Limulus-Differenz-Titers zur Vorhersage der Haltbarkeit kühlgelagerter pasteurisierter Konsummilch überprüft werden. Schließlich sollte die Einsatzmöglichkeit des Limulus-Differenz-Titers für produktionsbegleitende Untersuchungen aufgezeigt werden.

Der Limulus-Test wurde im Mikrotiterverfahren (SÜDI et al., 1981) mit dem "Endotoxin-Test 'Mini'" (MALLINCKRODT) durchgeführt. Als Standardendotoxin diente ein Präparat (MALLINCKRODT), das sich auf das zur Zeit gültige US-Referenzstandardendotoxin (RES) EC 5 bezieht. Die Empfindlichkeit des verwendeten Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL) betrug 0,6 EU bzw. 0,06 ng LPS/ml bezogen auf das oben erwähnte Standardendotoxin (vgl. 3.2.1.1). Bei den Untersuchungen von jeweils 100 Proben frisch pasteurisierter Konsummilch zweier Molkereibetriebe wurden LPS-Gehalte zwischen 3,4 und 107 ng/ml, mit einem durchschnittlichen LPS-Gehalt von 23,5 ng/ml ($\bar{x}_G$), gefunden, wobei 80 %

der Proben LPS-Gehalte zwischen 11 und 34 ng/ml enthielten. Bei vergleichender Betrachtung der Untersuchungsergebnisse aus den Molkereien A und B konnten keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der LPS-Gehalte frisch pasteurisierter Konsummilch festgestellt werden (vgl. Abb. 5 und 6 und Tab.5). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß in beiden Molkereien Rohmilch vergleichbarer Qualität hinsichtlich der Belastung mit gramnegativen Keimen zur Herstellung pasteurisierter Milch Verwendung fand. Der von JAKSCH (1983) zur Bewertung pasteurisierter Trinkmilch vorgeschlagene Richtwert von 100 ng LPS/ml wurde nur in einem Fall (107 ng LPS/ml) überschritten. Zu ähnlichen Resultaten kamen HEESCHEN et al. (1984), die in 422 Proben pasteurisierter Trinkmilch aus 61 Molkereien durchschnittlich 16,6 ng LPS/ml Probe fanden. JAKSCH (1983) stellte bei Untersuchungen einer allerdings begrenzten Anzahl von Handelsmilchproben (n = 54) durchschnittliche LPS-Gehalte von 50 ng/ml fest, wobei wiederum nur ein geringer Anteil (15 %) mehr als 100 ng LPS/ml enthielt. Aus der Literatur sind z.T. stark differierende Angaben bezüglich der LPS-Gehalte pasteurisierter Milch bekannt (vgl. JAKSCH, 1983). Die niedrigsten Werte wurden von MØLLER-MADSEN et al. (1980) mit 0,5 - 5 ng LPS/ml angegeben, während bei Untersuchungen, die in Südtalien von MONNO et al. (1980) durchgeführt wurden, sehr hohe Werte gefunden wurden ($3,2 \times 10^4$ - $1,28 \times 10^5$ ng LPS/ml). Untersuchungen von RONDINI et al. (1984) bestätigen die von JAKSCH (1983) geäußerte Vermutung, daß derartige Konsummilch aus Rohmilch mit einem regional bedingten, sehr hohen bzw. stark schwankenden Gehalt an gramnegativen Keimen hergestellt worden sei. Bei Untersuchungen von Proben aus der Region Milano bezüglich des Gehaltes an gramnegativen Keimen stellten RONDINI et al. (1984) starke Schwankungen fest ($10 - 5 \times 10^6$ /ml). Diese Schwankungen konnten dementsprechend bei gleichzeitigen Untersuchungen der Rohmilch sowie der im Labor frisch pasteurisierten Milch mit dem Limulus-Test bestätigt werden.

Auch bei ultrahocherhitzter Milch ist bei entsprechender Um-

rechnung der LPS-Gehalte - der LPS-Gehalt erhöht sich infolge technologischer Einflüsse bei der Ultrahocherhitzung um den Faktor 3,5 (SÜDI et al., 1982) - ein Rückschluß auf die hygienisch-bakteriologische Qualität der Rohmilch möglich.

Wie bereits erwähnt, werden gramnegative Keime bei der Pasteurisierung abgetötet und liegen direkt nach der Hitzebehandlung im Falle einer Rekontamination i.d.R. in sehr geringer Anzahl vor (BUSSE, 1975a; BLANKENAGEL, 1976; KLEEBERGER, 1976; SUHREN et al., 1979; TOLLE und SUHREN, 1982; SCHRÖDER, 1984; VISSER und DE GROOTE, 1984). Da mit dem Limulus-Test auch gelöste und freie Endotoxine sowie auch die LPS-Gehalte abgestorbener gramnegativer Mikroorganismen - in erhitztem Material fast ausschließlich letztere - erfaßt werden, ist eine Aussage nicht ohne weiteres möglich (ZAADHOF und TERPLAN, 1981). Die Erfassung von Rekontaminationskeimen gelingt nur unter Berücksichtigung der Keimvermehrung. Mit dem von TERPLAN et al. (1981) vorgeschlagenen Limulus-Differenz-Titer ist dies möglich. Nach Bestimmung des Ausgangs-LPS-Wertes erfolgt nach 24stündiger Bebrütung bei 20° C eine zweite Bestimmung (Belastungswert). Ein deutlicher Anstieg des LPS-Gehaltes (ΔLT_{24}) ist ein Hinweis auf die Vermehrung gramnegativer Keime, die, wie bereits dargestellt, nur einer Rekontamination entstammen können.

Wie den Ausführungen von SÜDI und HEESCHEN (1984) zu entnehmen ist, sind bei der Bestimmung der LPS-Gehalte im Mikrotiterverfahren Abweichungen von $\pm 0,25$ (Titerstufe) tolerierbar. Im Hinblick darauf wurde bei den Untersuchungen nur $\Delta LT_{24} > 0,25$ als Anstieg gewertet. Dementsprechend stieg der ΔLT_{24} bei Betrachtung des gesamten Probenmaterials bei 39,5 % (n=79) der Proben (Maximal- Δ -Werte: 2,25) an (Abb. 7). Von den Proben mit $\Delta LT_{24} \geq 0,5$ wiederum waren 59,5 % (n=47) mit $\Delta LT_{24} \geq 1$ gekennzeichnet.

Bei einem Vergleich der Produktion der Molkereien A und B waren im Betrieb A lediglich bei 31% der Proben, bei Betrieb B hingegen 48 % der Proben mit $\Delta LT_{24} \geq 0,5$ zu beobachten, wo-

bei hinsichtlich dieser Proben in Molkerei A 64,5 % (n=20), in Molkerei B 56,3% (n=27) $\Delta LT_{24} \geq 1$ aufwiesen (vgl. Abb.8 und 9). Wird davon ausgegangen, daß ein Anstieg des ΔLT_{24} auf die Vermehrung gramnegativer Rekontaminationskeime hinweist, kann abgeleitet werden, daß in Molkerei A häufiger Rekontaminationen vermieden werden konnten.

Um die Eignung des Limulus-Differenz-Titers zum Nachweis gramnegativer Rekontaminationskeime besser beurteilen zu können, wurden vergleichende Untersuchungen mit dem Weißenstephaner Rekontaminationstiter (KLEEBERGER, 1976), der bereits mehrfach zum Nachweis von Rekontaminationskeimen benützt wurde (KREUZER, 1978; GLAESER und FEUCHT, 1979; BRANDL, 1982; JAKSCH, 1983), in der Originalmethode (vgl. 3.2.1.2.1) auf einem Nährmedium durchgeführt, das aus 2 Teilen "Plate-Count-Agar" und 1 Teil Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar besteht. Auf dem Nährboden wachsen nach KLEEBERGER (1976) alle Gramnegativen sowie Enterokokken. Thermodure entwickeln sich so langsam, daß nach 24stündiger Bebrütung bei Zimmertemperatur noch keine Kolonien ausgebildet sind.

Zusätzlich wurde der Weißenstephaner Rekontaminationstiter auf dem von LANGEVELD et al. (1976) beschriebenen PCBA-Medium (Plate-Count-Agar mit Zusatz von 100 ppm Benzalkon) durchgeführt. Nach Angaben der Autoren entwickeln sich auf diesem Selektivmedium innerhalb von 24 Std. bei 20° C nur Gramnegative; alle thermoduren Keime einschließlich *Alcaligenes tolerans* werden in ihrem Wachstum unterdrückt. Allerdings wurde von WAES und BOSSUYT (1981) vereinzelt Wachstum aerober Sporenbildner beobachtet.

Bei Untersuchung identischer Proben waren daher u.U. auf dem VRB/PC-Medium höhere Rekontaminationstiter infolge Wachstums von Enterokokken zu erwarten als auf dem PCBA-Medium. Für insgesamt 58,5 % des Untersuchungsmaterials konnte dies bestätigt werden; übereinstimmende Ergebnisse wurden bei 36,5 % der Proben registriert. Lediglich bei 5 % (n=10) wurden auf dem

PCBA-Medium höhere Rekontaminationstiter festgestellt. Die Keimzahldifferenzen betrugen hier bei vier Proben < 10 , bei fünf Proben ≤ 25 Keime/100 ml; nur bei einer Probe erreichte die Keimzahldifferenz 300 Keime/100 ml, allerdings wurden in diesem Fall mit beiden Nachweisverfahren hohe Gehalte an Rekontaminationskeimen (1100 bzw. 1400/100 ml) nachgewiesen.

Von den 121 Proben, die sich mit dem Limulus-Test als rekontaminationsfrei ($\Delta LT_{24} \leq 0,25$) erwiesen hatten, waren mit dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter nur 27 als rekontaminationsfrei (< 3 Keime/100 ml) eingestuft worden; die übrigen Proben ($n=94$) wiesen bis zu 1400 Keime/100 ml auf (vgl. Tab.8). Auf dem PCBA-Medium stellten sich von den oben erwähnten 121 Proben 69 als rekontaminationsfrei dar (< 3 Keime/100 ml), 48 Proben erschienen mit < 25 Keimen/100 ml rekontaminiert, während nur in vier Fällen (30, 35, 40, 200 Keime/100 ml) Rekontaminationskeimzahlen > 25 Keime/100 ml ermittelt wurden (vgl. Tab. 7). Dieser Zusammenhang ist in Tab. 18 für das Gesamtmaterial entsprechend der beiden Molkereien A und B aufgeschlüsselt, wobei mit allen drei Methoden aufgezeigt werden konnte, daß in Betrieb A Rekontaminationen häufiger vermieden wurden und darüber hinaus in Betrieb B stärkere Rekontaminationen vermehrt auftraten. Sowohl in Molkerei A als auch in Molkerei B ist der prozentuale Anteil der mit dem ΔLT_{24} als rekontaminationsfrei erkannten Proben größer als jener, die auf dem PCBA-Medium rekontaminationsfrei waren und deren Anteil wiederum größer als die Anzahl der Proben, die mit dem VRB/PC-Medium als rekontaminationsfrei eingestuft worden waren; d.h. die Anteile (%) der als rekontaminationsfrei erkannten Proben verhalten sich für die drei Verfahren wie $\Delta LT_{24} > PCBA > VRB/PC$. Diese Beobachtung wird verständlich bei Berücksichtigung der z.T. unterschiedlichen Keimarten, die mit den verschiedenen Verfahren nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum PCBA-Medium entwickeln sich auf dem VRB/PC-Medium nach KLEEGER (1978) auch Enterokokken. Insofern war auf dem VRB/PC-Medium vermehrtes Keimwachstum zu erwarten, d.h. auf diesem Medium stellten

Tab. 18: Anteil der Proben (%) pasteurisierter Konsummilch, die sich in den Betrieben A und B jeweils mit dem Limulus-Differenz-Titer (ΔLT_{24}), dem Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium bzw. dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter (VRB/PC) als rekontaminationsfrei bzw. stark rekontaminiert erwiesen.

	Betrieb	Methode und Anteil der Proben (%)	
		ΔLT_{24}	Weihenstephaner Rekontaminationstiter (VRB/PC)
rekontaminations- frei ①	A	69	4,7
	B	52	29
stark rekonta- minierte ②	A	20	15
	B	27	22
			20 7 26 39

- ① als rekontaminationsfrei wurden gewertet: $\Delta LT_{24} \leq 0,25$, Keimzahlen auf VRB/PC bzw. PCBA < 3 Keime/100 ml
 ② als stark rekontaminiert wurden gewertet: $\Delta LT_{24} \geq 1$, Keimzahlen auf VRB/PC bzw. PCBA > 100 Keime/100 ml

sich weniger Proben als rekontaminationsfrei dar als auf dem PCBA-Medium. Auf dem letztgenannten Medium entwickeln sich gemäß Beobachtungen von WAES und BOSSUYT (1981) vereinzelt auch aerobe Sporenbildner, entsprechend war zu erwarten, daß auf diesem Medium wiederum weniger Proben als rekontaminationsfrei erscheinen würden als bei Untersuchungen mit dem ΔLT_{24} , der spezifisch für gramnegative Keime ist. Im Falle stark rekontaminierter Proben ($\Delta\text{LT}_{24} \geq 1$, Weißenstephaner Rekontaminationstiter (VRB/PC) bzw. Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium > 100 Keime/100 ml) scheint dieser Zusammenhang auf den ersten Blick nicht gegeben. Die Anteile der Proben (%), die sich mit den drei Methoden als stark rekontaminiert erwiesen hatten, verhalten sich folgendermaßen: $\Delta\text{LT}_{24} > \text{PCBA} < \text{VRB/PC}$. Einerseits entwickeln sich auf dem VRB/PC-Medium, wie bereits erwähnt, auch Enterokokken und tragen zu höheren Rekontaminationszahlen bei, andererseits wiesen bereits WAES und BOSSUYT (1981) darauf hin, daß sich im PCBA-Medium eine aggressivere selektive Substanz befindet als im VRB/PC-Medium und deshalb u.U. die Wachstumsgeschwindigkeit der Gramnegativen auf dem PCBA-Medium gegenüber jener auf dem VRB/PC-Medium vermindert sei. Die mit dem VRB/PC-Medium gegenüber dem PCBA-Medium vermehrt nachgewiesenen Rekontaminanten sind sicherlich auf diesen Faktor zurückzuführen. Mit dem Limulus-Test werden weder Enterokokken noch aerobe Sporenbildner erfaßt, außerdem finden bei der Durchführung des ΔLT_{24} keinerlei die Wachstumsgeschwindigkeit gramnegativer Keime beeinträchtigende selektive Substanzen Verwendung. Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse sind bei starker Rekontamination einerseits mit dem VRB/PC-Medium in größerem Umfang rekontaminierte Proben als auf dem PCBA-Medium zu erwarten, andererseits mit dem ΔLT_{24} wiederum ein höherer Anteil als auf dem PCBA-Medium.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß ein von WAES und BOSSUYT (1981) zur Bestimmung der Rekontamination mit der BC-ATP-Methode vorgeschlagenes Nährmedium (Plate-Count-Agar mit Zusatz von 0,06 % Benzalkon und 0,002 % Kristallviolett) (vgl.

2.2; LANGEVELD et al. (1976) und KLEEBERGER (1976)) nach Angaben der Autoren die Entwicklung von aeroben Sporenbildnern gänzlich unterdrückt und durch Erhöhung des Anteils von Benzalkon auf 0,07% auch jegliches Wachstum von Enterokokken ausgeschaltet werden kann. Auf die wachstumshemmende Wirkung derartiger selektiver Substanzen bezüglich gramnegativer Keime wurde bereits hingewiesen. Die Eignung des von WAES und BOSSUYT (1981) vorgeschlagenen Nährmediums für die Ermittlung des Weihenstephaner Rekontaminationstiters wurde bisher noch nicht geprüft. Den bisherigen Ausführungen kann entnommen werden, daß der ΔLT_{24} bezüglich der Erfassung gramnegativer Rekontaminationskeime dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter bzw. dem Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium überlegen ist.

Die Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch hängt, wie bereits mehrfach erwähnt, von der Rekontamination mit gramnegativen Keimen ab. Um die Eignung insbesondere des ΔLT_{24} zur Haltbarkeitsvorhersage zu überprüfen, wurden die Ergebnisse der Rekontaminationsbestimmungen (ΔLT_{24} , Weihenstephaner Rekontaminationstiter, Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium) zur sensorisch bestimmten Haltbarkeit in Beziehung gesetzt. Das Ende der Haltbarkeit der bei 10°C gelagerten Proben wurde durch tägliches Einzelrichten zweier Prüfpersonen nach dem 5-Punkte-Schema der DLG (1976) bestimmt. Mit 3 oder weniger Punkten bewertete Proben wurden, wenn das Ergebnis am darauffolgenden Tag bestätigt werden konnte, als verdorben beurteilt (SUHREN et al., 1975). Bei einem Vergleich der Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen mit der Haltbarkeit war mit Ansteigen der ΔLT_{24} bzw. der Rekontaminationstiter auf PCBA bzw. VRB/PC eine Verminderung der Haltbarkeit zu beobachten. Insgesamt waren die bei 10°C gelagerten Proben zwischen 2 und 6 Tagen haltbar, wobei 43,5 % erst am 5. Tag als verdorben beurteilt wurden (Haltbarkeit 4 Tage). Ähnlich lange Haltbarkeiten bei 10-12°C gelagerter pasteurisierter Milch wurden von RANDOLPH et al. (1965) ($\bar{x}$ = 4 Tage), KLEEBERGER (1976) (3-8 Tage), SUHREN et al. (1976) (1-6 Tage)

und JAKSCH (1983) (1-7 Tage) ermittelt. Längere Haltbarkeiten wurden von MARTINS et al. (1982) (9 - 17 Tage) und BISHOP et al. (1984) (1-17 Tage) beschrieben. Allerdings wurden die Proben bei diesen Untersuchungen bei niedrigen Temperaturen (7°C) gelagert. Auf den Zusammenhang zwischen Lagertemperatur und Haltbarkeit wurde bereits von HANKIN et al. (1977) und NIEMIERSKI et al. (1981) hingewiesen.

Bei der Zusammenfassung der mikrobiologischen Untersuchungen wurden die Ergebnisse in jeweils drei Klassen unterteilt; dabei wurde für den ΔLT_{24} die von JAKSCH (1983) vorgeschlagene, für den Weihenstephaner Rekontaminationstiter bzw. den Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium die von KLEEBERGER (1976) gewählten Klasseneinheiten zugrunde gelegt (siehe Abb. 19). Zwischen den Ergebnissen des ΔLT_{24} und jenen des Rekontaminationstiters auf dem PCBA-Medium konnte gute Übereinstimmung hinsichtlich der Haltbarkeit festgestellt werden. Proben mit einem $\Delta LT_{24} \geq 1$ (n=47) waren nie länger als drei Tage haltbar; auf dem PCBA-Medium konnte dies für Proben mit mehr als 100 Keimen/100 ml (n=37) mit Ausnahme einer Probe (siehe Anhang: Probe Nr.80) bestätigt werden (vgl. Tab. 9 und 11). Die Tatsache, daß mit dem ΔLT_{24} 47 Proben derartig hohe Differenztitere aufwiesen und auf dem PCBA-Medium nur 37 Proben mit mehr als 100 Keimen/100 ml festgestellt wurden, mag darauf zurückzuführen sein, daß, wie bereits oben dargestellt, gramnegative Rekontaminationskeime durch die zur Unterdrückung der thermotoleranten Begleitflora zugesetzte Selektivsubstanz in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit reduziert werden. Von den entsprechenden rekontaminationsfreien 121 Proben ($\Delta LT_{24} \leq 0,25$) waren 18 Proben nur drei Tage, die restlichen 103 Proben länger als drei Tage haltbar. Auf dem PCBA-Medium wurden 76 Proben als rekontaminationsfrei (<3 Keime/100 ml) eingestuft, von denen 52 Proben länger als drei Tage und 14 Proben nur drei Tage haltbar waren. Allerdings erwiesen sich von 46 Proben mit <10 Keimen/100 ml 38 Proben ebenfalls länger als drei Tage und acht Proben nur drei Tage haltbar. Bei Berücksichtigung der von WAES und BOSSUYT (1981) gemachten Beobachtungen, daß sich auf

dem PCBA-Medium vereinzelt auch aerobe Sporenbildner entwickeln können, kann angenommen werden, daß diese insbesondere bei niedrigen Keimzahlen ($<10/100$ ml) auf PCBA zu falschpositiven Resultaten und u.U. zu Fehleinschätzungen bei der Haltbarkeitsvorhersage führen können. Zieht man dies in Betracht, so wäre das Ergebnis auf PCBA fast identisch mit den Aussagen des ΔLT_{24} (ΔLT_{24} : 121 Proben $\leq 0,25$, Haltbarkeit >3 Tage bei 103 Proben; PCBA: 122 Proben <10 Keime/100 ml, Haltbarkeit >3 Tage bei 100 Proben).

Die Haltbarkeit der Proben, bei denen entsprechend den Ergebnissen des ΔLT_{24} längere Haltbarkeit zu erwarten gewesen wäre, wurde mit Ausnahme einer Probe (siehe Anhang: Probe Nr. 152) auch mit den beiden anderen Methoden nicht treffend vorhergesagt. Hinweise auf eventuell verminderte Rohmilchqualität (Einfluß hitzeresistenter Enzyme bzw. Metabolite) waren den Limulusausgangstitern dieser Proben nicht zu entnehmen.

Für die Ergebnisse des Weihenstephaner Rekontaminationstiters waren ähnlich klare Beziehungen zur Haltbarkeit wie für jene des ΔLT_{24} bzw. des Rekontaminationstiters auf dem PCBA-Medium nicht immer gegeben. Dies ist sicherlich auf den bereits angesprochenen Nachteil des Nährmediums (Wachstum von Enterokokken) zurückzuführen.

Die Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch entsprach bei beiden Molkereien den Ergebnissen der Rekontaminationsbestimmungen, d.h. in Molkerei A, bei der Rekontaminationen häufiger vermieden werden konnten (Abb. 8), waren Haltbarkeiten >3 Tage bei 66 Proben festzustellen (Abb. 17) während in Molkerei B, bei der häufiger starke Rekontaminationen nachgewiesen wurden, derartig lange Haltbarkeit nur von 54 Proben erreicht wurde (Abb. 9 und 18 sowie Tab. 18).

Bei der statistischen Berechnung wurde für alle drei Verfahren eine enge Beziehung ($p < 0,001$) zur sensorisch ermittelten Haltbarkeit festgestellt. Anhand der Korrelationskoeffizienten

war allerdings diese Beziehung für den ΔLT_{24} ($r = -0,73$) und den Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium ($r = -0,67$) etwas stärker ausgeprägt als für den Weißenstephaner Rekontaminationstiter ($r = -0,55$). Eine derartige Beziehung zur Haltbarkeit ($p < 0,001$) hatte bereits JAKSCH (1983) für ΔLT_{24} und den Weißenstephaner Rekontaminationstiter festgestellt; allerdings lag den Berechnungen ein relativ begrenzter Probenumfang zugrunde ($n = 46$).

Zur Bestimmung der Rekontamination pasteurisierter Konsummilch und zur Haltbarkeitsvorhersage scheint der Limulus-Differenz-Titer mindestens ebenso geeignet zu sein wie der Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium. Trotz der statistisch gesicherten Beziehung des Weißenstephaner Rekontaminationstiters, deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, daß mit dem PCBA-Medium klarere Aussagen getroffen werden können. Ein wesentlicher Vorteil des ΔLT_{24} ist, daß die Ergebnisse innerhalb kürzerer Zeit vorliegen. In dieser Hinsicht vergleichbare Verfahren (BC-ATP-Methode, Impedanz-Messung) erfordern spezielle, mit hohen Anschaffungskosten verbundene Geräte (siehe Tab.2). Praktische Erfahrungen bezüglich der Bestimmung der Rekontamination pasteurisierter Milch mit Gramnegativen bzw. zur Haltbarkeitsvorhersage liegen bisher für die beiden letztgenannten Methoden allerdings kaum vor. Zusätzlich erlaubt der Limulus-Test im Zusammenhang mit der Haltbarkeitsvorhersage bzw. Rekontaminationsbestimmung anhand des LPS-Ausgangswertes auch nach der Hitzebehandlung eine Aussage über die bakteriologisch-hygienische Qualität der Rohmilch und über eine damit verbundene eventuelle Belastung mit hitzeresistenten Enzymen (Lipasen und Proteasen), die einen vorzeitigen Verderb pasteurisierter Milch bedingen können.

Die Kosten der gebrauchsfertigen Mikrotitertabletts (30 Einzeltests je Tablett) dürften bei Berücksichtigung der vielseitigen Informationen, die der Limulus-Test ermöglicht (Rohmilchqualität, Bestimmung einer Rekontamination durch gramnegative Keime, Haltbarkeitsvorhersage) der praktischen Anwen-

dung nicht im Wege stehen. Derzeit liegt der Preis für 1 Mikrotitertablett bei ca. DM 50 (MALLINCKRODT, 1985).

Um einen Überblick über die Produktionshygiene bzw. den Erfolg von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen bei den einzelnen Abfüllanlagen zu erhalten, wurden die bereits besprochenen Ergebnisse (ΔLT_{24} , Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium, Weihenstephaner Rekontaminationstiter) den jeweils fünf Abfüllanlagen (I bis X) der Molkereien A und B zugeordnet.

Während in Betrieb A bei vier Abfüllanlagen Rekontaminationen weitgehend vermieden werden konnten, war dies bei einer Abfüllanlage (V) nicht gewährleistet; 71 % der Proben dieser Abfüllanlage waren durch $\Delta LT_{24} \geq 1$ und verminderte Haltbarkeit gekennzeichnet (vgl. Tab. 14). Da alle fünf Anlagen aus einem gemeinsamen Tank gespeist wurden und derartig hohe ΔLT_{24} bei den anderen vier Anlagen nicht feststellbar waren (vgl. Abb. 20 und 21), konnte die Anlage V als Rekontaminationsquelle angenommen werden. Nach Angaben des Betriebspersonals handelte es sich dabei um eine Anlage älteren Modells, die besonders schwer zu reinigen und zu desinfizieren war. Auch bei Durchführung wiederholter, besonders gründlicher Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen konnte die Rekontaminationsquelle nicht beseitigt werden. Insbesondere bei Anlagen, die bereits längere Zeit betrieben wurden, können immer wiederkehrende Rekontaminationen durch Materialverschleiß (Dichtungsmaterial) infolge dauernder starker mechanischer und thermischer Beanspruchung bedingt sein (VÖGELE, 1978; DREWS et al., 1983). Diese Vermutungen wurden bestätigt, da, nachdem die Abfüllanlage V durch eine neue ersetzt worden war, derartige Rekontaminationen nicht mehr nachzuweisen waren.

In Betrieb B waren einerseits rekontaminationsfreie Proben ($\Delta LT_{24} \leq 0,25$) seltener als in Betrieb A festzustellen (vgl. Abb. 8 und 9), andererseits wurden stark rekontaminierte Proben ($\Delta LT_{24} \geq 1$) mehrfach bei allen Abfüllanlagen gefunden.

Ablagerungen und Verunreinigungen können sich im Leitungs- und

Behältersystem, das die Milch zwischen Hitzebehandlung und Abfüllsystem durchläuft, in schwer zu reinigenden und zu desinfizierenden Toträumen (Dreiwegehähne, T-Stücke) an Ventilen, Dichtungen und produktionssteuernden Vorrichtungen ansammeln bzw. festsetzen. Während der Betriebsruhe können sich Rekontaminationskeime an diesen Stellen besonders leicht anreichern und vor allem bei Produktionsbeginn verstärkt ausgeschwemmt werden (SCHRÖDER, 1984).

Aus diesem Grunde wurden insgesamt drei Tagesproduktionen anhand von Endproduktuntersuchungen überprüft.

Die zu Beginn der ersten überprüften Tagesproduktion untersuchten Proben waren stark rekontaminiert ($\Delta LT_{24} \geq 2$), alle weiteren im Abstand von je 2 Stunden entnommenen erwiesen sich als rekontaminationsfrei (Tab. 15). Dies konnte bei der Überprüfung einer weiteren Tagesproduktion (Tab. 16) bestätigt werden; bei Produktionsbeginn wurde ein ΔLT_{24} von 1,75 festgestellt, während alle weiteren Untersuchungen nur noch $\Delta LT_{24} = 0,5$ aufwiesen. Die Ergebnisse des ΔLT_{24} stimmten jeweils mit jenen des Weißenstephaner Rekontaminationstiters bzw. des Rekontaminationstiters auf dem PCBA-Medium überein. Entsprechend den Überlegungen von MARSHALL und HARMON (1978) bzw. in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von SCHRÖDER (1984) ist anzunehmen, daß sich Rekontaminationskeime während der Betriebsruhe in der Produktionslinie anreicherten und zu Beginn der nächsten Tagesproduktion ausgeschwemmt wurden. Bei den entsprechenden Milchpackungen war folglich mit deutlich reduzierter Haltbarkeit zu rechnen.

Bei der dritten Kontrolle einer Tagesproduktion war wiederum bei Produktionsbeginn eine starke Rekontamination ($\Delta LT_{24} = 2,25$, Weißenstephaner Rekontaminationstiter bzw. Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium 1400 Keime/100 ml) festzustellen, allerdings konnte dies auch für die drei folgenden Untersuchungen (nach 2, 4 und 6 Stunden) bestätigt werden. Verminderung der Rekontamination war erst nachweisbar (vgl. Tab.

17), nachdem Tank I, aus dem die Abfüllanlage während dieser Zeit gespeist worden war, leer war und die Milch aus einem weiteren Tank (II) zur Abfüllung gelangte. Offensichtlich war es in Tank I bereits zu einer starken Kontamination gekommen, so daß die gesamte aus diesem Tank stammende Produktion betroffen war.

Um nachträglich einen Hinweis auf die Rekontaminationsquelle zu erhalten, wurde das Ergebnis des in diesem Betrieb routinemäßig durchgeführten Colititers mit Zusatz von Bromkresolpurpur (sichere Aussagen liegen nach 48 Stunden vor) für Tank I nachträglich mit zur Interpretation der eigenen Untersuchungsergebnisse herangezogen. Obwohl, wie bereits erwähnt, coliforme Keime in gekühlter Milch nur einen Teil der gramnegativen Rekontaminationsflora repräsentieren (OLSON et al., 1953; NELSON und BAKER, 1954; ANDERSON, 1966; BUSSE, 1966; BLANKE-NAGEL, 1976; LANGEVELD, 1976; KREUZER, 1978) und zudem deren direkter Nachweis im Anschluß an die Erhitzung i.d.R. zu wenig empfindlich ist, um eine Rekontamination nachzuweisen (OLSON, 1971; GLÄSER und FEUCHT, 1979; WINTERER, 1982), wurden in Tank I sogar in 0,1 ml pasteurisierter Milch coliforme Keime nachgewiesen.

Den vorliegenden Untersuchungen ist zu entnehmen, daß durch Endproduktkontrollen, wie sie von KLEEBERGER (1976) bzw. SUHREN (1980) vorgeschlagen wurden, auch mit dem Limulus-Differenz-Titer sowohl der Erfolg von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen, insbesondere nach längerer Betriebsruhe, überprüft und Rekontaminationen der Produktionslinie innerhalb kurzer Zeit erkannt werden können. Bei entsprechender Probennahme (z.B. zu Beginn, während und gegen Ende der Produktion) kann die Haltbarkeit einer gesamten Tagesproduktion vorhergesagt werden.

Ein schnelles und sicheres Auffinden von Rekontaminationsquellen ist allerdings nur durch tägliche produktionsbegleitende Untersuchungen, d.h. Probennahme an verschiedenen Stel-

len der Produktionslinie (in-line-sampling), wie sie z.B. von MARSHALL und HARMON (1978) sowie BIGALKE (1980) empfohlen wurden, gewährleistet.

Der Limulus-Differenz-Titer erscheint für diesen Zweck als schnelle, sichere und relativ preisgünstige Methode geeignet.

5. Zusammenfassung

200 Proben pasteurisierter Konsummilch aus zwei Molkereibetrieben wurden mit dem Limulus-Test auf ihren Gehalt an Lipopolysacchariden (LPS) untersucht. Diese Gehalte lagen zwischen 3,4 und 107, im Mittel bei 23,5 ng/ml.

Der Limulus-Differenz-Titer dieser Proben wurde verglichen mit dem Weißenstephaner Rekontaminationstiter und dem gleichen Verfahren auf dem PCBA-Medium hinsichtlich der Eignung, Rekontaminationen mit gramnegativen Keimen bzw. die voraussichtliche Haltbarkeit zu ermitteln. Der Limulus-Differenz-Titer eignet sich dafür zumindest ebenso gut wie der Rekontaminationstiter auf dem PCBA-Medium. Beide Untersuchungsverfahren ermöglichen zuverlässigere Aussagen als der Weißenstephaner Rekontaminationstiter. Die Beziehungen der Ergebnisse dieser drei Untersuchungsverfahren zur sensorisch ermittelten Haltbarkeitsgrenze von bei 10° C gelagerter pasteurisierter Konsummilch waren mit $p < 0,001$ statistisch gesichert.

Anhand von Endproduktkontrollen bei mehreren Tagesproduktionen einer Molkerei wurden Möglichkeiten für den Einsatz des Limulus-Differenz-Titers als produktionsbegleitendes Untersuchungsverfahren aufgezeigt.

Der Limulus-Differenz-Titer eignet sich zur Überprüfung des Erfolgs von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen und ermöglicht ein sicheres und rasches Auffinden von Rekontaminationsquellen.

6. Summary

Application of the Limulus-Test for the detection of contamination with gramnegative bacteria and the prediction of the keeping quality of pasteurized milk.

200 samples of pasteurized market milk from two dairy plants were investigated by the Limulus-Test on their contents of lipopolysaccharides (LPS). These contents ranged from 3,4 to 107 with a mean of 23,5 ng/ml.

The Limulus difference titer of these samples was compared with two other recontamination tests ("Weihestephan" and PCBA medium) with regard to the suitability for the detection of post-pasteurization contamination by gramnegative bacteria and the prediction of the keeping quality of pasteurized milk. For this purpose the Limulus difference titer is at least as useful as the recontamination test using PCBA medium. Both tests provide more reliable results than the "Weihestephan" recontamination test. All three methods are well correlated ($p < 0,001$) to the sensorially examined keeping quality of pasteurized market milk (stored at 10° C).

Examining the end products of several day's productions in a dairy plant the application of the Limulus difference titer as a monitoring system could be demonstrated.

The Limulus difference titer is a suitable method for controlling the success of sanitation and for a quick and reliable detection of sources of post-pasteurization contamination.

7. Verzeichnis des Schrifttums

ABO-ELNAGA, I.G. (1966):

Der Einfluß der Hitzebehandlung auf den Bakteriengehalt der Milch.

Milchwiss. 21 (9), 561-564.

ANDERSON, L. (1966):

Vorinkubation der behandelten Milch bei der Bestimmung psychrophiler Bakterien.

Milchwiss. 21, 287-289.

ASHTON, R. (1950):

Some bacteriological aspects of the deterioration of pasteurized milk.

J. Dairy Res. 17, 261-286.

BAYNES, N.C., J. COMRIE, J.H. PRAIN (1983):

Detection of bacterial growth by the Maltus conductance meter. Med. Labor. Sci. 40, 149-158.

BECK, G. (1959):

Die Bedeutung der Stufenkontrolle in milchhygienischer Beziehung.

Milchwiss. 2, 65-67.

BIGALKE, D. (1980):

Proper line sampling can identify post-pasteurization contamination.

Amer. Dairy Review 42 (5), 32-34.

BIRKELAND, S., S. MELNES, T. SORHAUG (1983):

Hurtigmetode for bestemmelse av psykrotrofe bakterier. Limulus amobocyt lysat-metoden.

Meieriposten 72 (26) 680, 682-688, ref. in Dairy Sci. Abstr. 46 (5), 350 (1984).

BISHOP, J.R., C.H. WHITE, R. FIRSTENBERG-EDEN (1984):

Rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk.

J. Food Protect. 47 (6), 471-475.

BLANKENAGEL, G. (1976):

An examination of methods to assess post-pasteurization contamination.

J. Milk Food Technol. 39, 301-304.

BLANKENAGEL, G. (1982):

Relationship between the bacteriological quality of raw milk and that of pasteurized milk and cream.

Kieler Milchw. Forschber. 34 (1), 158-162.

BOCKELMANN von, B. (1973):

Aseptic packaging of milk.

Alimenta 12, 119-126.

BOSSUYT, R. (1981):

Determination of bacteriological quality of raw milk by ATP assay technique.

Milchwiss. 36 (5), 257-260.

BOSSUYT, R.G., G.M. WAES (1983):

Impedance measurements to detect post-pasteurization contamination of pasteurized milk.

J. Food Protect. 46 (7), 622-624.

BRANDL, E. (1968):

Die Mikroflora der Rohmilch und ihre Beeinflussung durch die Pasteurisierung der Milch.

Österr. Milchwirtsch. 23 (9), 149-154.

BRANDL, E. (1982):

Zum Problemkreis Trinkmilchhaltbarkeit.

23. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft DVG: Lebensmittelqualität und Verbraucherschutz vom 28. Sept. bis 1. Okt. 1982 in Garmisch-Partenkirchen.

BUCHHOLZ-BERCHTOLD, S. (1977):

Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mit dem Limulus-Test.

Vet. med. Diss. München.

BÜLTE, M. (1983):

Die Impedanzmessung und das Biolumineszenzverfahren als anwendbare Schnellmethoden zur Erfassung der mikrobiellen Kontamination auf Fleischoberflächen.

Vet. med. Diss. Berlin.

BUSSE, M. (1966):

Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der bakteriologischen Qualität kühlgelagerter Milch.

Milchwiss. 21 (5), 289-293.

BUSSE, M. (1975a):

Halbarkeit - Eine Herausforderung im Kräftefeld Molkerei, Handel und Überwachung.

Tsch. Milchwirtsch. 96, 225-230.

BUSSE, M. (1975b):

Zur Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch.

Dtsch. Molk.-Ztg. 96, 1590-1591.

CADY, P., D. HARDY, S. MARTINS, S.W. DUFOUR, S.J. KRAEGER (1978):
Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content.

J. Food Protect. 41 (4), 277-283.

COATES, D.A. (1977):

Short communication. Enhancement of the sensitivity of the limulus assay for the detection of gram negativ bacteria.

J. Appl. Bact. 42, 445-449.

COGHILL, D., H.S. JUFFS (1979):

Comparison of the Moseley Keeping Quality Test for pasteurized milk and cream products with other tests of shorter duration.

Austral. J. Dairy Technol. 34, 118-120.

COUSIN, M.A. (1982):

Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. A review.

J. Food Protect. 45 (2), 172-202.

COUSIN, M.A., E.H. MARTH (1977):

Cheddar cheese made from milk, that was precultured with psychrotrophic bacteria.

J. Dairy Sci. 60 (2), 1048-1056.

DEETH, H.C., C.H. FITZGERALD (1976):

Lipolysis in dairy products: A review.

Austr. J. Dairy Technol. 36, 53-64.

DEMETER, K.J. (1952):

Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

DLG (1979):

DLG-Prüfbestimmungen für Milch und Milchprodukte.

19-28.

DREWS, M., A. GRASSHOFF, H. HAGEMEISTER, W. HEESCHEN, M. PFEUF-
FER, H. REUTER, G. SUHREN, J. THOMASOW, A. TOLLE, H. WIETBRANK (1983):
Aktuelle Fragen zur pasteurisierten Konsummilch.

Kieler Milchw. Forschber. 35, 107-236.

DRIESSEN, F.M., J. STADHOUDERS (1975):

Lipolysis in hard cheese made from pasteurized milk.

IDF doc. 86, Proceedings of the Lipolysis Symposium, 101-107.

DRUCE, R.G., S.B. THOMAS (1972):

Bacteriological studies on bulk milk collection: Pipeline
milking plants and bulk milk tanks as sources of bacterial
contamination of milk - A review.

J. Appl. Bact. 35, 253-270.

EDEN, G., R. EDEN (1984):

Enumeration of microorganisms by their dynamic as conductance
patterns.

IEEE transactions on biomedical engineering 31 (2), 193-198.

ELLIKER, P.R., E.L. SING, L.J. CHRISTENSEN, W.E. SANDINE (1964):
Psychrophilic bacteria and keeping quality of pasteurized
dairy products.

J. Milk Food Technol. 27, 69-75.

FELMINGHAM, D., H.S. JUFFS (1977):

Comparison and evaluation of keeping quality tests for pa-
steurized milk and cream products.

Austr. J. Dairy Technol. 32, 158-162.

FIRSTENBERG-EDEN, R. (1983):

Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat
by impedance measurement.

Food Technol. 37, 64-70.

FIRSTENBERG-EDEN, R., M.K. TRICARICO (1983):

Impedimetric determination of total, mesophilic and psychro-
trophic counts in raw milk.

J. Food Sci. 48, 1750-1754.

FIRSTENBERG-EDEN, R., ZINDULIS, J. (1984):

Electrochemical changes in media due to microbial growth.

J. Microbiol. Methods 2, 103-115.

FLEISCHER, A., E.E. SCHMID, A. MÜLLER (1981):

The Limulus test in microbiological quality control.

Pharm. Acta Helv. 56 (7), 186-189.

FLÜCKINGER, E. (1981):

Bacterial contamination and multiplication during the trans-
port of milk from the farm to the dairy and during the sto-
rage in the dairy.

Kieler Milchw. Forschber. 33, 347-356.

GEBRE-EGZIABHER, A., E.S. HUMBERT, G. BLANKENAGEL (1980):

Heat-stable proteases from psychrotrophs in milk.

J. Food Protect. 43 (3), 197-200.

GERRITS, H. (1976):

Haltbarkeitsverlängerung von Frischprodukten aus Praxisnähe beurteilt.

Dtsch. Molk.-Ztg. 97, 1554-1557.

GINZINGER, W. (1981):

Zum Einfluß der Rohmilchkeime in der Emmentaler Produktion. Milchwirtsch. Ber. 69, 265-268.

GLÄSER, H., I. FEUCHT (1979):

Bestimmung des Reinfektionstitors und des Coliformentiters in pasteurisierter Milch.

Dtsch. Milchwirtsch. 32, 1158-1159.

GNAN, S., L.O. LUEDECKE (1982):

Impedance Measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count.

J. Food Protect. 45 (1), 4-7.

GRAF, S. (1980):

Vergleichende Prüfung verschiedener Verfahren zur Bestimmung der Rekontaminationsrate in pasteurisierter Trinkmilch.

Vet. med. Diss. Wien.

GRASSHOFF, A. (1980):

Untersuchungen zum Strömungsverhalten von Flüssigkeiten in zylindrischen Toträumen von Rohrleitungen.

Kieler Milchwirtsch. Forschber. 32 (4), 273-298.

GROSSKOPF, J.C., W.J. HARPER (1969):

Role of psychrophilic sporeformers in long life milk.

J. Dairy Sci. 52, 897.

HANKIN, L., W.F. DILLMAN, G.R. STEPHENES (1977):

Keeping quality of pasteurized milk for retail sale related to code data storage temperature and microbial counts.

J. Food Protect. 40, 848-853.

HANSEN, K., T. MIKKELSEN, A. MØLLER-MADSEN (1982):

Use of the Limulus test to determine the hygienic status of milk products as characterized by levels of gram-negative bacterial lipopolysaccharide present.

J. Dairy Res. 49 (2), 323-328.

HARDY, D., S.J. KRAEGER, S.W. DUFOUR, P. CADY (1977):

Rapid detection of microbial contamination in frozen vegetables by automated impedance measurements.

Appl. Env. Microbiol. 34 (1), 14-17.

HEESCHEN, W., J. SÜDI, G. SUHREN (1984):

Die Anwendung des Limulus-Tests zur Untersuchung wärmebehandelter Milch.

Dtsch. Molk.-Ztg. 32, 1038-1043.

HEESCHEN, W., G. SUHREN, A. TOLLE (1981):

Bakteriologisch-biochemische Kriterien der Milch und ihre Beziehung zu Frische, Haltbarkeit und Qualität.

Dtsch. Milchwirtsch. 32 (2), 1660-1664; 44, 1682-1684.

JAKSCH, P. (1983):

Der Limulus-Test zur Bewertung der hygienischen Qualität von Milch und Milchprodukten insbesondere im Hinblick auf Haltbarkeit und Weiterverarbeitung der Milch.

Vet. med. Diss. München.

JAKSCH, P., G. TERPLAN, K.-J. ZAADHOF (1983):

Estimation of the hygienic quality of food of animal origin by means of the Limulus-Test.

XXII World Veterinary Congress, Perth Australia, Abstracts Booklet.

JAKSCH, P., K.-J. ZAADHOF, G. TERPLAN (1982):

Zur Bewertung der hygienischen Qualität von Milchprodukten mit dem Limulus-Test.

Molk.-Ztg. Welt der Milch 36 (1), 5-8.

JAKSCH, P., K.-J. ZAADHOF, G. TERPLAN (1983):

Untersuchung zum LPS-Gehalt von Milch und Milchprodukten und zur Eignung des Limulus-Tests zur Vorhersage der Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch.

Dtsch. Molk.-Ztg. 104, 1604-1610.

JÜTTNER, R.-R. (1985):

Prophylaktische Labormaßnahmen im Zuge der Sorgfaltspflicht eines milchverarbeitenden Betriebes zur Absicherung der Produktion.

Dtsch. Milchwirtsch. 15, 444-450.

KANDLER, O. (1960):

Über die Hitzeresistenz und den Nachweis der Mikroflora in kurzzeiterhitzter Milch.

Milchwiss. 15, 165-171.

KANDLER, O. (1964):

Keimgehalt der Anlieferungsmilch und die Qualität der Molke-reiprodukte.

Dtsch. Molk.-Ztg. 85 (8), 271-358.

KIELWEIN, G. (1971):

Pseudomonaden und Aeromonaden in Trinkmilch: Ihr Nachweis und ihre Bewertung.

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 15-19.

KIELWEIN, G. (1981):

Bakteriologischer Status und technologische Wertigkeit der Verarbeitungsmilch.

Milchwirtsch. Berichte 66, 17-22.

KIELWEIN, G., H. MELLING; B. HORSCH (1978):

Einiges zur Haltbarkeit wärmebehandelter Milch.

Dtsch. Molk.-Ztg. 99, 420-425.

KLEEGERGER, A. (1976):

Nachweis von Reinfektionskeimen in Konsummilch und Schlagsahne.

Molk.-Ztg. Welt der Milch 30, 1539-1544.

KLEEGERGER, A. (1978):

Bakteriologische Untersuchungsmethoden zur Qualitätsbeurteilung.
Dtsch. Milchwirtsch. 38, 1380-1385.

KLEEGERGER, A. (1979):

Methoden zur Bestimmung der Rekontaminationsrate.
Dtsch. Milchwirtsch. 30, 1601-1605.

KREUZER, K. (1978):

Erfahrungen mit dem Weißenstephaner Rekontaminationstiter in
Konsummilch.

Molk.-Ztg. Welt der Milch 31 (35), 1129-1130.

LANGEVELD, L.P.M. (1977):

Zuivelzucht 69, 500, in: Tolle, A., G. Suhren, I. Otte, W.
Heeschen (1979): Zur Bakteriologie und Sensorik der pasteu-
risierten Trinkmilch.

Milchwiss. 34 (7), 406-410.

LANGEVELD, L.P.M., F. CUPERUS (1980):

The relation between temperature and growth rate in pasteu-
rized milk of different types of bacteria which are important
to the deterioration of that milk.

Neth. Milk Dairy J. 34, 106-125.

LANGEVELD, L.P.M., F. CUPERUS; P. VAN BREEMEN, J. DIJKERS (1976):

A rapid method for the detection of post-pasteurization con-
tamination in HTST pasteurized milk.

Neth. Milk Dairy J. 30, 157-173.

LANGEVELD, L.P.M., F. CUPERUS, J. STADHOUDERS (1973):

Bacteriological aspects of the keeping quality at 5°C of
reinfected and non-reinfected pasteurized milk.

Neth. Milk Dairy J. 27, 54-65.

LAW, B.A., A.T. ANDREWS, M.E. SHARPE (1977):

Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases
from a strain of Pseudomonas fluorescens isolated from raw milk.

J. Dairy Res. 44, 145-148.

LIMMER, H. (1957):

Untersuchungen über den Keimgehalt der Milch in den Trinkmilch-Versorgungsgebieten einer mitteldeutschen Großstadt.
Dtsch. Milchwirtsch. 11, 247-250, 272-275.

LIMMER, H.-D. (1979):

Ursachen der Rekontamination und deren Verhinderung.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 33, 993-993

LIMMER, H.-D., F.B. SCHEDDIN (1978):

Rekontaminationsfreie Abfüllung - kurze Produktionslinie.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 31, 846.

LUBIENIECKI-von SCHELHORN, M. (1970):

Keimfreimachung: Stand der Sterilisierung von Packstoffen.
Ernährungswirtschaft/Lebensmitteltechnik 10, 810-814.

MALLINCKRODT (1983):

Produktinformation.

MALLINCKRODT (1985):

Pyrogen^R Limulus Amöbozyten-Lysat zur in vitro Prüfung auf Endotoxine.

MARSHALL, R.T., C.C. HARMON (1978):

The automated pyruvate method as a quality test for grade A milk.

J. Food Protect. 41 (3), 168-177.

MARTINS, S.B., S. HODAPP, S.W. DUFOUR, S.J. KRAEGER (1982):

Evaluation of a rapid impedimetric method for determining the keeping quality of milk.

J. Food Protect. 45 (13), 1221-1226.

MCCRADY, M.H., E.M. LANGEVIN (1932):

The coli-aerogenes determination in pasteurization control.
J. Dairy Sci. 15, 321-329.

MIKOLAJCIK, E.M. (1978):

Psychrotrophic sporformers: A possible keeping quality problem in market milk.

American Dairy Review 40 (4), 34A-34D.

MIKOLAJCIK, E.M., R.B. BRUCKER (1983):

Limulus amoebocyte lysate assay. A rapid test for the assessment of raw and pasteurized milk quality.

Dairy Food Sanitation 3 (4), 129-131.

MILLER, I. (1966):

Psychrotrophe Streptokokken.

Milchwiss. 21 (5), 266-269.

MØLLER-MADSEN, Aa. (1982):

The hygienic level of dairy products, characterized by gram-negative bacterial lipopolysaccharide.

Kieler Milchwirtsch. Forschber. 34 (1), 147-149.

MØLLER-MADSEN, A., T. MIKKELSEN, K. HANSEN (1980):

Gram-negative bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in milk and dairy products.

Bretning, Statens Forsøgsmejeri no. 240.

MOL, H., H.M. VICENTIE (1981):

Psychrotrophic microorganisms in milk and milk products in the Netherlands, in: Roberts, T.A., G. Hobbs, J.H.B. Christian und N. Skovgaard (1981): Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenity.

Academic Press, New York.

MONNO, R., A. PANARO, I. MUNNO (1980):

Sul contenuto endotossinico di campioni di latte pastorizzato: approccio preliminare.

Giorn. Bakt. Virol. Immun. LXXIII 228-233.

MOSELEY, W.K. (1958):

What is being learned from total counts on Cottage cheese?

Proc. 51st An. Conv. Milk Ind. Found (Lab.Sect.), P. 27, zit. nach Thomas (1969).

MOSELEY, W.K. (1980):

Pinpointing post-pasteurization contamination.

J. Food Protect. 43, 414.

MROZEK, H. (1970):

Hygienegefahren bei der Lebensmittelherstellung.

Arch. Hyg. 154 (3), 240-246.

MILL, L.E., S.V. PILKHANE, R.L. RICHTER, K.L. SMITH (1974a):

A comparison of selected shelf-life tests for pasteurized fluid milk.

J. Dairy Sci. 57, 138.

MULL, L.E., S.V. PILKHANE, R.L. RICHTER, K.L. SMITH (1974b):

Shelf-life of pasteurized milk stored at 4,5 and 7,0° C.

J. Milk Food Technol. 37, 530-531.

NELSON, F.E., M.P. BAKER (1954):

The influence of time and temperature of plate incubation upon bacterial counts of market milk and related products, particularly after holding under refrigeration.

J. Milk Food Technol. 17, 95-100.

NIEMIERSKI, P., U. FEIER, D. GROSSKLAUS (1982):

Der Einfluß von Temperatur und Zeit auf den Pasteurisationseffekt bei der Kurzzeiterhitzung von Milch.

Milchwiss. 37 (3), 133-138.

NIEMIERSKI, P., D. GROSSKLAUS, U. FEIER (1981):

Bestimmung der Beurteilungskriterien für die Ermittlung der Mindesthaltbarkeit von pasteurisierter Konsummilch.

Vet. Med. Berichte 1/1981. Institut für Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes.

NÜBL, E. (1981):

Organisation der Betriebskontrolle in einem großstädtischen Be- und Verarbeitungsbetrieb.

Milchwirtsch. Berichte 68, 183-186.

O'CONNOR, F. (1979):

An impedance method for determination of bacteriological quality of raw milk.

Ir. J. Food Sci. Technol. 3, 93-100.

OHKI, M., T. NAKAMURA, T. MORITA, S. IWANAGA (1980):

A new endotoxin sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe crab.

FEBS Lett. 120 (2), 217-220.

OLIVERIA, J.S., C.E. PARMELEE (1976):

Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk.

J. Milk Food Technol. 39, 269-272.

OLSON, H.C. (1971):

Bacteriological testing of milk for regulatory purposes - usefulness of current procedures and recommendations for change.

J. Milk Food Technol. 34, 279-281.

OLSON, H.C., D.S. WILLOUGHBY, E.L. THOMAS, H.A. MORRIS (1953):

The keeping quality of pasteurized milk as influenced by the growth of psychrophilic bacteria and the addition of aureomycin.

J. Milk Food Technol. 16, 213-219.

PALMER, J. (1981):

Contamination of milk from the milking environment.

Kieler Milchw. Forschber. 33, 307-316.

PATEL, G.B., G. BLANKENAGEL (1972):

Bacterial counts of raw milk and flavour of the milk after pasteurization and storage.

J. Milk Food Technol. 35 (4), 203-206.

PETTE, J.W. (1962):

Das Verderben der Milch. In: Lang, K.: Milch und Milchprodukte.

Aktuelle Probleme bei Erzeugung, Behandlung und Verbrauch.

Wiss. Veröffentlichung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung

8, 70-75, Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt.

RAMEY, N.J., T.S. TSAI (1983):

Rapid detection of microorganisms by concentration and luminescence techniques.

United Technologies, Packard Instrument Co.

RANDOLPH, H.E., T.R. FREEMAN, R.W. PETERSON (1965):

Keeping quality of market milk obtained at retail outlets and at processing plants.

J. Milk Food Technol. 28, 92-96.

RICHARDS, J.C.S., A.C. JASON, G. HOBBS, D.M. GIBSON, R.H. CHRISTIE (1978):

Electronic measurement of bacterial growth.

J. Phys. E: Sci. Instrum. 11, 560-568.

RONDINI, G., C. ZAMPIERI, G. OTTAGALLI (1984):

Il Limulus test per la valutazione della qualità microbiologica (in gram-negativi) del latte crudo e pastorizzato.

Industrie Alimentari 23 (215), 327-330.

SCHLÜSSLER, H.-J., H. MROZEK (1968):

Praxis der Flaschenreinigung, Henkel & Cie. GmbH, Düsseldorf, in: Mrozek, H. (1970): Hygienegefahren bei der Lebensmittelherstellung.

Arch. Hyg. 154 (3), 240-246.

SCHRÖDER, M.J.A. (1984):

Origins and levels of post pasteurization contamination of milk in the dairy and their effects on keeping quality.

J. Dairy Res. 51, 59-67.

SCHRÖDER, M.J.A., C.M. COUSIN, C.H. MCKINNON (1982):

Effect of psychrotrophic post-pasteurization contamination on the keeping quality at 11 and 5°C of HTST-pasteurized milk in the UK.

J. Dairy Res. 49, 619-630.

SCHULZE, W.D., J.C. OLSON (1960):

Studies on psychrophilic bacteria. I. Distribution in stored commercial dairy products.

J. Dairy Sci. 43, 346-350.

SHEHATA, T.E., E.B. COLLINS (1971):

Isolation and identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk.

Appl. Microbiol. 21 (3), 466-469.

SING; E.L. (1972):

Program for quality assurance of finished dairy products.

J. Milk Food Technol. 35 (4), 207-212.

SING, E.L., P.R. ELLIKER, L.J. CHRISTENSEN, W.E. SANDINE (1967):

Effective testing procedures for evaluating plant sanitation.

J. Milk Food Technol. 30, 103-111.

SONDERDRUCK (1981):

Technik und Produkte. Colititer mit Zusatz von Bromkresolpurpur.

Dtsch. MolK.-Ztg. 49, 1647-1648.

STADHOUDERS, J. (1972):

Technological aspects of the quality of raw milk.

Neth. Milk Dairy J. 26, 68-90.

STADHOUDERS, J. (1975):

Microbes in milk and dairy products. An ecological approach.

Neth. Milk Dairy J. 29, 104-126.

STADHOUDERS, J. (1982):

Cooling and thermization as a mean to extend the keeping quality of raw milk.

Kieler Milchw. Forschber. 34, 19-28.

STADHOUDERS, J., G. HUP, L.P.M. LANGEVELD (1980):

Some observations of the germination, heatresistance and out-growth of fast-germinating and slow-germinating spores of *Bacillus cereus* in pasteurized milk.

Neth. Milk Dairy J. 34, 215-228.

STORGARDS, T. (1961):

Zusammenhang zwischen Rohmilchqualität und Trinkmilchqualität.

Milchwiss. 16, 113-119.

STUMACHER, R.J., M.J. KOVNAT, W.R. McCABE (1973):

Limitations of the usefulness of the Limulus assay for endotoxin.

N. Engl. J. Med. 288, 1261-1264.

SÜDI, J., W. HEESCHEN (1983):

Anwendung des Limulus-Tests zur Beurteilung der Milch von der Erzeugung bis zum Konsum.

Dtsch. Milchwirtsch. 21, 692-698.

SÜDI, J., W. HEESCHEN (1984):

Untersuchungen zur quantitativen Aussage des Limulus-Tests über die mikrobiologische Beschaffenheit von Milch und Milchprodukten.

Arch. Lebensmittelhyg. 35, 32-35.

SÜDI, J., G. SUHREN, W. HEESCHEN, A. TOLLE (1981):

Entwicklung eines miniaturisierten Limulus-Tests im Mikrotiter-System zum quantitativen Nachweis gram-negativer Bakterien in Milch und Milchprodukten.

Milchwiss. 36 (4), 193-198.

SÜDI, J., G. SUHREN, W. HEESCHEN, A. TOLLE (1982):

Die Anwendung des Limulus-Tests zur Untersuchung ultrahocherhitzter Milch und Ermittlung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit des verwendeten Rohstoffes.

Milchwiss. 37 (6), 341-346.

SUHREN, G., W. HEESCHEN, A. TOLLE (1975):

Zur Messung des Verderbnisrisikos von Milch.

Milchwiss. 30, 473-475.

SUHREN, G., W. HEESCHEN, A. TOLLE (1976):

Keimgehalt und Haltbarkeit bei Konsummilch.

Dtsch. Milchwirtsch. 27 (1), 452-460.

SUHREN, G., W. HEESCHEN, A. TOLLE (1979):

Zur bakteriologischen Wertigkeit von Konsummilch.

Dtsch. Milchwirtsch. 30 (2), 1128-1134.

SUHREN, G., W. HEESCHEN, A. TOLLE (1980):

Vorschlag zur Prüfung der Haltbarkeit pasteurisierter Milch.
Dtsch. MolK.-Ztg. 101, 1208-1212.

TERPLAN, G., J. BIERL, H.-H. GROVE, K.-J. ZAADHOF (1981):

Zur Beurteilung der Hygiene bei der Gewinnung und Verarbeitung von Lebensmitteln mit dem Limulustest.

Arch. Lebensmittelhyg. 32, 15-19.

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF, S. BUCHHOLZ-BERCHTOLD (1975):

Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mit dem Limulus-Test.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 217-221.

TINOYE, O.L., L.G. HARMON (1975):

Growth of thermotolerant psychrotrophic bacteria in refrigerated milk.

American Dairy Review 37 (9), 26-30.

THOMAS, S.B. (1966):

Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk.

Milchwiss. 21, 270-275.

TOLLE, A., W. HEESCHEN, H. WERNERY, J. REICHMUTH, G. SUHREN (1972):

Die Pyruvatbestimmung - ein neuer Weg zur Messung der bakteriologischen Wertigkeit von Milch.

Milchwiss. 27 (6), 343-352.

TOLLE, A., G. SUHREN (1982):

Pasteurisierte Konsummilch - Keimvermehrung und Grenzwerte für die Haltbarkeit.

Dtsch. MolK.-Ztg. 22, 728-734.

TOLLE, A., G. SUHREN, W. HEESCHEN (1981):

Zur pasteurisierten Konsummilch unter bakteriologisch-hygienischen Aspekten.

MolK.-Ztg. Welt der Milch 35, 965-969.

TOLLE, A., G. SUHREN, J. OTTE, W. HEESCHEN (1979):

Zur Bakteriologie und Sensorik der pasteurisierten Konsummilch.
Milchwiss. 34 (7), 406-410.

UR, A., D.F.J. BROWN (1975):

Impedance monitoring of bacterial activity.
Med. Microbiol. 8, 19-28.

VISSER, J.J.R., J.M.F.H. DE GROOTE (1984):

The Malthus microbiological growth analyser as an aid in the detection of post-pasteurization contamination of pasteurized milk.

Neth. Milk Dairy J. 38, 151-156.

VÖGELE, P. (1978):

Haltbarkeit pasteurisierter Milch aus der Sicht eines Verpackungsherstellers.

Molk.-Ztg. Welt der Milch 32 (48), 1544-1546.

WAES, G., R. BOSSUYT (1981):

A rapid method to detect postcontamination in pasteurized milk.
Milchwiss. 36 (9), 548-552.

WAES, G.M., R.G. BOSSUYT (1982):

Usefulness of the benzalkon-crystal violet-ATP method for predicting the keeping quality of pasteurized milk.

J. Food Protect. 45 (10), 928-931.

WALLNER, U. (1975):

Über den mikrobiellen Verderb von pasteurisierter Trinkmilch und Schlagrahm. Diplomarbeit TU München-Weihenstephan, in: Kleeberger, A. (1979): Methoden zur Bestimmung der Rekontaminationsrate.

Dtsch. Milchwirtsch. 30, 1601-1605.

WASHAM, G.J., H.C. OLSON, E.R. VEDAMUTHU (1977):

Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk.

J. Food Protect. 40 (2), 101-108.

WINTERER, H. (1981):

Verfahren zur Keimzahlbestimmung.

Milchwirtsch. Berichte 68, 211-215.

WINTERER, H. (1982):

Haltbarkeitskontrolle bei verschiedenen Milchprodukten unter Anwendung von Kontaminationsnachweisen.

Milchwirtsch. Berichte 72, 179-184.

ZAADHOF, K.-J., G. TERPLAN (1981):

Der Limulus-Test - ein Verfahren zur Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von Milch und Milchprodukten.

Dtsch. Molk.-Ztg. 34, 1094-1098.

Anhang: Einzelergebnisse der Untersuchungen zur Ermittlung der Rekontamination und der Haltbarkeit pasteurisierter Konsummilch (n = 200)

Molkerei A

Proben Nr.	Δ LT	Δ LT ₂₄	Keime/100 ml (VRB/PC)	Keime/100 ml (PCBA)	Halt- barkeit (d)
1	2,5	1,0	95	95	2
2	2,5	0,5	9	20	3
3	2,5	0	0	0	3
4	2,5	0	4	0	3
5	2,5	1,0	45	45	2
6	2,5	0	0	0	5
7	2,5	0	0	0	5
8	2,5	0	0	0	3
9	2,5	0	0	0	4
10	2,25	0	0	0	4
11	2,5	0	4	4	3
12	2,75	0,25	7	4	4
13	2,75	0,25	0	4	4
14	2,5	1,5	1400	1400	2
15	2,5	0	4	4	4
16	2,0	0,75	40	4	4
17	2,25	0	40	4	5
18	2,75	1,75	1400	1400	2
19	2,5	0	4	0	4
20	2,5	0	0	0	4
21	2,5	0,5	200	45	4
22	2,5	1,0	450	95	3
23	2,5	1,0	1400	1400	2
24	2,75	0,25	6	3	4
25	3,0	0,5	3	0	5
26	2,5	0,25	16	40	4
27	3,0	0,25	6	4	4
28	2,5	0	16	0	3
29	2,5	0,5	11	0	4
30	2,5	0,5	15	11	3
31	2,5	1,0	75	75	3
32	2,5	1,5	1400	1400	2
33	3,0	0,5	40	7	4
34	3,0	0,75	200	0	4
35	3,0	0,5	150	0	5
36	2,75	1,25	1400	1400	2
37	2,75	0,25	16	9	4
38	2,75	0,25	6	0	4
39	3,0	0	0	0	4
40	3,0	0	16	3	3

Proben Nr.	Δ LT	Δ LT ₂₄	Keime/100 ml (VRB/PC)	Keime/100 ml (PCBA)	Halt- barkeit (d)
41	3,25	1,25	1400	1400	2
42	3,0	0	4	4	4
43	3,0	0,25	7	0	4
44	2,25	0	15	0	4
45	2,25	2,25	1400	1400	2
46	2,75	0	0	0	4
47	2,75	0	15	0	4
48	1,75	0	6	0	4
49	2,75	0	40	0	3
50	2,25	2,25	1400	1400	2
51	2,5	0	3	0	4
52	2,75	0	0	0	4
53	2,75	0	0	0	3
54	2,75	0	15	0	3
55	2,5	1,75	1400	1400	2
56	2,75	0,25	30	0	3
57	2,75	0,25	7	0	3
58	2,5	1,75	1400	1400	2
59	2,5	0	0	0	5
60	2,5	1,5	1400	1400	2
61	2,75	0	30	35	4
62	2,75	0	35	20	4
63	2,5	0	7	3	4
64	2,5	0	11	7	4
65	2,5	0,5	1100	35	3
66	2,25	0	6	0	4
67	2,25	0,25	6	0	4
68	2,25	0,25	6	6	4
69	2,25	0	6	3	4
70	2,75	1,25	1400	1400	2
71	2,25	0	7	0	4
72	2,25	0	3	0	4
73	2,25	0	0	0	4
74	2,25	0	0	0	4
75	2,25	2,0	1400	1400	2
76	2,75	0	0	0	4
77	2,75	0	9	20	5
78	2,5	0	7	4	5
79	2,5	0	15	9	4
80	3,0	0	1100	200	4
81	2,25	1,25	1400	95	3
82	2,25	1,25	1100	250	3
83	2,0	0	1100	20	4
84	2,25	0	6	6	4
85	2,25	1,25	450	95	3
86	2,5	0	3	0	4
87	2,5	0	7	0	4
88	2,25	0	250	0	4

Proben Nr.	Δ LT	Δ LT ₂₄	Keime/100 ml (VRB/PC)	Keime/100 ml (PCBA)	Halt- barkeit (d)
89	2,25	0	30	0	4
90	2,25	0,25	1100	0	4
91	2,0	0	15	0	4
92	2,0	0	6	3	5
93	2,25	0	6	3	5
94	2,25	0	1400	9	5
95	2,25	0,5	40	0	5
96	2,5	0,25	0	0	5
97	2,75	0,25	0	0	5
98	2,5	0	0	0	5
99	2,5	0	0	0	5
100	2,5	0	40	3	5

Molkerei B

Proben Nr.	Δ LT	Δ LT ₂₄	Keime/100 ml (VRB/PC)	Keime/100 ml (PCBA)	Halt- barkeit (d)
101	3,0	0,25	75	0	4
102	2,5	0,25	3	0	4
103	2,25	0	0	0	3
104	2,25	0,75	150	15	3
105	2,5	0	0	0	4
106	2,5	0,5	20	9	4
107	2,5	1,0	450	20	3
108	2,5	1,75	1100	450	3
109	2,5	0	20	3	5
110	2,5	0,25	7	11	5
111	2,5	0,75	95	35	4
112	2,25	0	7	0	4
113	2,25	0	3	0	4
114	2,25	1,75	1400	1400	2
115	2,0	1,0	450	75	3
116	2,5	0,5	9	0	3
117	2,5	0	1400	0	5
118	2,5	1,5	1400	1400	2
119	2,5	1,5	1400	14	2
120	2,5	1,0	1400	1400	2
121	2,5	1,0	1400	1400	2
122	2,25	1,25	1400	1400	2
123	2,25	1,75	1100	20	3
124	2,5	0	6	0	5
125	2,5	0	35	0	5
126	2,0	0	25	0	5
127	2,75	1,0	1100	1400	3
128	2,75	0	15	0	5
129	2,75	0	6	0	6
130	2,5	0,25	6	0	4
131	2,75	0,25	3	0	4
132	3,0	0	0	0	4
133	3,0	1,25	1400	1400	2
134	3,0	1,0	450	95	3
135	3,0	0	0	0	3
136	3,0	0	0	0	4
137	3,0	1,5	75	45	3
138	3,0	0,25	20	4	4
139	3,0	0	1400	20	4
140	3,0	0	45	4	4
141	3,0	1,25	1400	1400	2
142	3,0	0	250	0	5
143	2,75	0,75	25	45	3
144	2,75	0,25	20	11	4
145	2,75	0,25	20	7	5
146	3,0	0,75	20	7	3
147	2,5	1,25	450	95	3
148	2,75	0,5	45	7	4

Proben Nr.	Δ LT	Δ LT ₂₄	Keime/100 ml (VRB/PC)	Keime/100 ml (PCBA)	Halt- barkeit (d)
149	3,0	0	4	3	4
150	3,0	0	0	0	5
151	2,75	0,25	75	20	4
152	2,5	0,25	250	30	3
153	2,75	0	45	9	3
154	2,75	0	15	7	3
155	2,75	0	0	0	4
156	3,0	0	11	0	4
157	3,0	0	11	7	4
158	2,75	0,25	16	16	4
159	2,5	0,25	4	4	4
160	2,5	0,25	4	0	3
161	2,5	0,25	4	0	3
162	2,75	0,25	1400	7	4
163	2,75	1,25	1100	1100	2
164	2,5	0,75	1400	1100	3
165	2,5	0,75	1400	1400	3
166	2,5	0,5	1400	1400	3
167	2,5	0,75	1100	1100	3
168	2,75	0,5	14	15	4
169	2,75	0,75	15	7	4
170	2,75	0,75	20	15	3
171	2,75	0	11	0	4
172	2,75	0,25	15	4	4
173	2,75	0	30	7	4
174	2,75	0	150	15	4
175	2,5	0	1400	15	5
176	2,75	0	1100	15	5
177	3,0	0	30	4	5
178	2,75	0,75	250	30	4
179	2,5	0	4	0	4
180	2,5	0	9	4	4
181	2,5	0	6	6	4
182	2,5	0,5	4	15	4
183	3,0	0,75	7	7	3
184	3,0	0,75	7	6	3
185	2,75	0,75	7	7	3
186	2,75	0,75	11	7	4
187	2,5	0,25	3	0	5
188	2,75	0	20	15	5
189	3,0	0	4	0	4
190	3,0	1,0	450	450	2
191	2,5	1,5	250	250	3
192	2,5	1,5	95	95	2
193	2,5	1,25	75	75	2
194	2,5	1,0	1100	1100	3
195	2,5	1,5	1400	1400	2
196	2,5	1,5	1400	1400	3
197	2,75	1,25	1400	1400	2
198	2,75	1,25	1400	1400	2
199	2,75	1,25	1400	1400	2
200	2,5	0,75	1400	0	4

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine freundliche und großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. P. Jaksch für seine Hilfe und Beratung.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Fräulein Eberwein, möchte ich meinen Dank aussprechen. Für das Schreiben der Arbeit herzlichen Dank an Frau Spensberger.

L e b e n s l a u f

Klaus Peter
B a c h m e i e r

geb. 16.05.1956 in Mühldorf

Eltern:

Helmut Bachmeier, Angela Bachmeier,
geb. Huber

1962-1967

Besuch der Volksschule in Töging,
Landkreis Altötting

1967-1976

Besuch des Ruperti-Gymnasiums Mühldorf

25.06.1976

Reifeprüfung

1976-1977

Wehrdienst

1977-1982

Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

1.02.1983

Approbation als Tierarzt

Seit dieser Zeit freier Mitarbeiter in
verschiedenen tierärztlichen Praxen.

